

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
 INSTITUT NATIONAL
 DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 PARIS

(11) N° de publication : 2 767 135
 (à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 98 05032

(51) Int Cl⁶ : C 07 K 14/705, C 07 K 14/715, C 12 N 15/12

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 22.04.98.

(30) Priorité : 06.08.97 FR 09710088.

(71) Demandeur(s) : GENSET SOCIETE ANONYME — FR et INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE INSERM — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 12.02.99 Bulletin 99/06.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Ce dernier n'a pas été établi à la date de publication de la demande.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(72) Inventeur(s) : BIHAIN BERNARD, BOUGUELERET LYDIE et YEN POTIN FRANCES.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

(54) RECEPTEUR COMPLEXE LSR, ACTIVITE, CLONAGE, ET APPLICATION AU DIAGNOSTIC, A LA PREVENTION ET/OU AU TRAITEMENT DE D'OBESITE ET DES RISQUES OU COMPLICATIONS ASSOCIES.

(57) L'invention concerne un nouveau polypeptide récepteur complexe LSR (Lipolysis Stimulated Receptor), caractérisé par ses activités fonctionnelles, le clonage des ADNc complémentaires des ARNs messagers codant pour chacune des sous-unités du complexe multimérique, des vecteurs et cellules transformées, des méthodes de diagnostic et de sélection de composés utilisables à titre de médicament pour la prévention et/ ou le traitement de pathologies et/ ou de pathogénies telles que l'obésité et l'anorexie, les hyperlipidémies, l'athérosclérose, le diabète, l'hyper-tension, et plus généralement les diverses pathologies associées à des anomalies du métabolisme des cytokines.

RECEPTEUR COMPLEXE LSR, ACTIVITE, CLONAGE,
ET APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC, A LA PREVENTION
ET/OU AU TRAITEMENT DE L'OBESITE ET DES RISQUES
OU COMPLICATIONS ASSOCIES.

5

L'invention concerne un nouveau polypeptide récepteur complexe LSR (Lipolysis Stimulated Receptor), caractérisé par ses activités fonctionnelles, le clonage des ADNC complémentaires des ARNs messagers codant pour 10 chacune des sous-unités du complexe multimérique, des vecteurs et cellules transformées, des méthodes de diagnostic et de sélection de composés utilisables à titre de médicament pour la prévention et/ou le 15 traitement de pathologies et/ou de pathogénies telles que l'obésité et l'anorexie, les hyperlipidémies, l'athérosclérose, le diabète, l'hyper-tension, et plus généralement les diverses pathologies associées à des anomalies du métabolisme des cytokines.

L'obésité est un problème de santé publique à la 20 fois grave et répandu : dans les pays industrialisés, le tiers de la population présente un excès de poids d'au moins 20 % par rapport au poids idéal. Le phénomène ne fait que s'accentuer, dans les régions du globe dont les économies se modernisent, comme les îles du Pacifique, 25 et de façon générale. Aux Etats-Unis, le taux de personnes obèses est passé de 25 % à la fin des années 70 à 33 % au début des années 90.

L'obésité augmente de façon considérable le risque de développer des maladies cardio-vasculaires ou 30 métaboliques. On estime que si toute la population avait un poids idéal, le risque d'insuffisance coronarienne serait diminué de 25 % et celui d'insuffisance cardiaque et d'accidents vasculaires cérébraux de 35 %.

L'insuffisance coronarienne, la maladie athéromateuse et l'insuffisance cardiaque sont au premier rang des complications cardio-vasculaires induites par l'obésité. Pour une surcharge pondérale supérieure à 30 %, 5 l'incidence des affections coronariennes se trouve doublée, chez des sujets de moins de 50 ans. Les études menées pour d'autres maladies sont toutes aussi éloquentes. Pour un surpoids de 20 %, le risque d'hypertension artérielle est doublé. Pour un surpoids de 30 %, 10 le risque de développer un diabète non insulino-dépendant est triplé. Celui des hyperlipidémies est multiplié par 6.

La liste des maladies dont l'apparition est favorisée par l'obésité est longue : hyperuricémie (11,4 % chez les sujets obèses, contre 3,4 % dans la 15 population générale), pathologies digestives, anomalies des fonctions hépatiques et même, certains cancers.

Que les altérations physiologiques de l'obésité se caractérisent par une augmentation du nombre des 20 cellules adipeuses, ou par une augmentation de la quantité de triglycérides stockés dans chaque cellule adipeuse, ou par les deux, cette surcharge résulte principalement d'un déséquilibre entre les quantités de calories absorbées et celles des calories dépensées par 25 l'organisme. Les recherches sur les causes de ce déséquilibre ont pris plusieurs directions. Certains se sont attachés à étudier le mécanisme d'absorption des aliments, et donc, les molécules qui contrôlent la prise alimentaire et la sensation de satiété. D'autres études 30 ont porté sur le métabolisme de base, c'est-à-dire la façon dont l'organisme utilise les calories absorbées.

Les traitements de l'obésité qui sont proposés sont de quatre types. La restriction alimentaire est le plus

fréquemment utilisé. Les obèses se voient conseiller de changer leurs habitudes alimentaires, de façon à absorber moins de calories. Ce type de traitement est efficace à court terme. Toutefois le taux de récidive 5 est très important. L'augmentation des dépenses caloriques par l'exercice physique est également proposée. Ce traitement appliqué seul est inefficace mais il améliore toutefois la perte de poids chez les sujets suivant un régime hypocalorique. La chirurgie 10 gastro-intestinale, qui diminue l'absorption des calories ingérées, est efficace mais a été virtuellement abandonnée en raison des effets secondaires qu'elle entraîne. L'approche médicamenteuse met en jeu, soit 15 l'action anorexigène de molécules intervenant au niveau du système nerveux central, soit l'effet de molécules qui augmentent les dépenses énergétiques en augmentant la production de chaleur. Le prototype de ce type de molécule sont les hormones thyroïdiennes qui découpent 20 les phosphorylations oxydatives de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les effets secondaires et la toxicité de ce type de traitement rendent leur utilisation dangereuse. Une approche qui vise à diminuer 25 l'absorption des lipides alimentaires en les séquestrant dans la lumière du tube digestif est également mise en place. Toutefois, elle induit des déséquilibres physiologiques difficilement tolérables : déficit 30 d'absorption des vitamines liposolubles, flatulence et stéatorhée. Quelle que soit l'approche thérapeutique envisagée, les traitements de l'obésité se caractérisent tous par un taux de récidive extrêmement important.

Les mécanismes moléculaires responsables de l'obésité chez l'homme sont complexes et font appel à des facteurs génétiques et environnementaux. En raison

de la faible efficacité des traitements connus jusqu'à présent, il est urgent de définir les mécanismes génétiques qui déterminent l'obésité, de façon à pouvoir développer des médicaments mieux ciblés.

Plus de 20 gènes ont été étudiés en tant que candidats possibles, soit qu'ils aient été impliqués dans des maladies dont l'obésité est l'une des manifestations cliniques, soit qu'ils soient des homologues de gènes intervenant dans l'obésité chez les modèles animaux. Situé dans la région chromosomique 7q31, le gène OB est l'un des plus étudiés. Son produit, la leptine, intervient dans les mécanismes de la satiété. La leptine est une protéine plasmatique de 16 kDa produite par les adipocytes sous l'action de différents stimuli. Les souris obèses de type ob/ob présentent un déficit du gène de la leptine ; cette protéine est indétectable dans le plasma de ces animaux. L'administration de leptine obtenue par génie génétique, à des souris ob/ob corrige leur hyperphagie relative et permet la normalisation de leur poids. Cet effet anorexigène de la leptine met en jeu un récepteur du système nerveux central : le récepteur ob qui appartient à la famille des récepteurs aux cytokines de classe 1. Le récepteur ob est déficient chez les souris obèses de la race db/db. L'administration de leptine à ces souris est sans effet sur leur prise alimentaire et ne permet pas de réduction importante de leur poids. Les mécanismes par lesquels les récepteurs ob transmettent le signal de satiété ne sont pas connus avec précision. Il est vrai-semblable que le neuropeptide Y soit impliqué dans cette voie de signalisation. Il est important de préciser à ce stade que les récepteurs ob ne sont pas les seuls régulateurs de l'appétit. Le

récepteur Melanocortin 4 intervient également, puisque les souris rendues déficientes pour ce récepteur sont obèses (Gura, 1997).

La découverte de la leptine et la caractérisation du récepteur de la leptine au niveau du système nerveux central ont fait naître une nouvelle voie de recherche de médicaments contre l'obésité. Ce modèle s'est cependant rapidement révélé décevant. En effet, à une seule exception près (Montague et al., 1997), les gènes codant pour la leptine ou pour son récepteur ob se sont révélés normaux chez les sujets humains obèses. De plus, et de façon paradoxale, les concentrations plasmatiques de leptine, hormone de satiété, sont anormalement élevées chez la plupart des sujets humains obèses. L'essentiel des efforts de recherche thérapeutique dans ce sens a porté sur la caractérisation de l'effet de la leptine au niveau du système nerveux central.

La présente invention résulte d'une focalisation de l'effort de recherche sur la découverte des mécanismes d'élimination de la leptine. L'hypothèse de travail la plus généralement admise est que les taux plasmatiques de leptine sont élevés chez les sujets obèses parce que cette hormone est produite par le tissu adipeux et que la masse grasse est augmentée chez les sujets obèses. Les inventeurs ont formulé une hypothèse différente et postulé que les concentrations de leptine sont augmentées chez les obèses car la clairance de cette hormone est réduite. Ce déficit entraîne un syndrome de résistance à la leptine et l'individu obèse développe une réponse adaptée aux concentrations élevées de leptine. Dans cette perspective, le traitement des sujets obèses devrait consister non pas en une augmentation des taux de leptine mais en une

normalisation de ceux-ci. A ce stade, il est essentiel de rappeler que les récepteurs de type ob sont des récepteurs de type signalisation. Ces récepteurs peuvent fixer la leptine au niveau de la membrane plasmique mais 5 ne peuvent faire entrer la protéine à l'intérieur de la cellule pour qu'elle y soit dégradée. Les récepteurs ob ne sont pas des récepteurs d'endocytose.

La présente invention est donc relative à un récepteur complexe, en particulier de cellule hépatique, 10 caractérisé en ce qu'il est capable, en présence d'acides gras libres, de fixer des lipoprotéines, et en absence d'acides gras libres, de fixer une cytokine, de préférence la leptine, les lipoprotéines et la cytokine fixées étant incorporées puis dégradées par la cellule, 15 ledit récepteur pouvant fixer en outre la protéine gC1q-R ou une de ses protéines analogues.

L'invention vise en outre des polypeptides constituants dudit récepteur, leurs séquences d'acides aminés et d'acide nucléique ainsi que toutes séquences 20 nucléiques obtenues à partir desdites séquences d'acide nucléique. Les polypeptides recombinants obtenus à partir desdites séquences d'acides nucléiques font aussi partie de l'invention.

L'invention comprend également des vecteurs de 25 clonage et/ou d'expression contenant l'une de ces séquences nucléiques ainsi que les cellules hôtes et mammifères animaux transformés par ces vecteurs.

L'invention comprend également des anticorps ou des dérivés d'anticorps spécifiques dudit récepteur.

30 L'invention concerne en outre des méthodes de détermination et de diagnostic de variabilité allélique, d'anomalie génétique ainsi que d'expression anormale du récepteur selon l'invention.

L'invention comprend également des méthodes de sélection de composé chimique ou biochimique permettant de moduler l'expression ou l'activité du récepteur selon l'invention.

5 L'invention comprend enfin des composés capables de moduler l'expression ou l'activité dudit récepteur, à titre de médicament pour la prévention de pathologies et/ou de pathogénies telles que l'obésité et l'anorexie, 10 l'hypertension, et plus généralement les diverses pathologies associées à des anomalies du métabolisme des cytokines.

La présente invention concerne donc un récepteur complexe, en particulier de cellule hépatique, 15 caractérisé en ce qu'il est capable, en présence d'acides gras libres, de fixer des lipoprotéines, et en absence d'acides gras libres, de fixer une cytokine, de préférence la leptine, ledit récepteur pouvant fixer en outre la protéine gC1q-R (Ghebrehiwet et al., 1994) ou 20 une de ses protéines analogues.

Les inventeurs ont en effet caractérisé un récepteur complexe, notamment hépatique, dénommé récepteur LSR, récepteur complexe dont l'activité est double. Le récepteur LSR permet d'une part l'endocytose de 25 lipoprotéines, lorsqu'il est activé par les acides gras libres, servant ainsi de voie de clairance des lipoprotéines. Cette voie sert principalement, mais non exclusivement pour la clairance des particules riches en triglycérides d'origine intestinale (Mann et al., 1995). 30 Cette activité, exprimée tout particulièrement au niveau hépatique, est dépendante de la présence d'acides gras libres qui, en se fixant au récepteur, induisent un changement réversible de la conformation de ce complexe

et lui permettent de fixer avec une haute affinité différentes classes de lipoprotéines comme celles contenant de l'apoprotéine B ou de l'apo-protéine E.

D'autre part, dans des conditions normales, en 5 l'absence d'acides gras libres, le récepteur complexe LSR ne fixe pas les lipoprotéines, mais est capable de fixer une cytokine, en particulier la leptine, puis de les internaliser et de la dégrader.

Le récepteur selon l'invention fixe en outre la 10 protéine gC1q-R, récepteur de la protéine C1q qui est un des composants du complexe C1 de la voie classique d'activation du complément. Toute protéine analogue à la protéine gC1q-R, peut également se fixer au niveau du site de fixation de la protéine gC1q-R sur le récepteur 15 selon l'invention. Par protéines analogues de gC1q-R, on entend notamment les protéines homologues présentant de préférence un taux d'homologie de séquence d'acides aminés d'au moins 80 %, les protéines présentant au moins un des motifs d'un site de fixation de la protéine 20 gC1q-R sur le récepteur LSR et/ou les protéines capables d'interagir avec le récepteur LSR, notamment en présence du composé C1q ou de l'un de ses composés analogues.

Selon l'invention, ce récepteur complexe est en outre caractérisé en ce que les lipoprotéines fixées ou 25 la cytokine fixée sont incorporées dans la cellule puis dégradées, les lipoprotéines fixées contenant notamment de l'apoprotéine B ou E.

L'invention a également pour objet un récepteur complexe selon l'invention, caractérisé en ce que le 30 composé C1q, ou un de ses composés analogues comme notamment AdipoQ (Hu et al., 1996), apM1 (Maeda et al., 1996) et la cérébelline, est capable de moduler l'activité dudit récepteur. En particulier, le composé

C1q ou un de ses composés analogues, permet, en absence d'acide gras libre, d'accroître la quantité de lipoprotéines fixées sur ledit récepteur de la cellule et/ou d'accroître l'internalisation et la dégradation desdites lipoprotéines fixées par ladite cellule.

L'invention concerne les polypeptides, caractérisés en ce qu'ils sont un constituant du récepteur selon l'invention.

Il doit être compris que l'invention ne concerne pas les polypeptides sous forme naturelle, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas pris dans leur environnement naturel mais qu'ils ont pu être obtenus par purification à partir de sources naturelles, ou bien obtenus par recombinaison génétique, ou encore par synthèse chimique et pouvant alors comporter des amino-acides non naturels, comme cela sera décrit ci-après.

L'invention concerne également les polypeptides, caractérisés en ce que lesdits polypeptides sont des polypeptides équivalents, homologues ou variants de polypeptide selon l'invention, ou un de leurs fragments. Ces fragments seront de préférence des fragments codés par une séquence nucléique comportant au moins 10 bases, et/ou des fragments biologiquement actifs.

L'invention concerne également les polypeptides, caractérisés en ce qu'ils comprennent une séquence d'acides aminés choisie parmi :

- a) une séquence d'acides aminés selon la figure 2, la figure 4, la figure 6, la figure 8, la figure 10, la figure 40, la figure 42, la figure 44, la figure 49, la figure 50 ou la figure 51 ;
- b) une séquence d'acides aminés de polypeptide variant de polypeptide de séquence d'acides aminés de a) ;

- c) une séquence d'acides aminés de polypeptide équivalent à un polypeptide de séquence d'acides aminés de a) ou b) ;
- d) une séquence d'acides aminés de polypeptide homologue comportant au moins 80 % d'homologie, de préférence au moins 90 %, avec un polypeptide de séquence d'acides aminés de a), de b), ou de c) ;
- e) un séquence d'acides aminés d'un fragment, de préférence biologiquement actif, de polypeptide de séquence d'acides aminés de a), de b), de c), ou de d).

Font également partie de l'invention, les polypeptides caractérisés en ce qu'ils sont constitués d'une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences d'acides aminés telles que définies précédemment dans a), b), c), d), ou e).

Parmi les polypeptides selon l'invention, on préfère également les polypeptides comprenant ou constitués par une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences d'acides aminés telles que définies précédemment dans a), b), c), d), ou e), caractérisés en ce qu'ils sont un constituant du récepteur selon l'invention.

Parmi les polypeptides selon l'invention, on préfère les polypeptides comprenant ou constitués par une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences humaines.

Dans la présente description, on utilisera le terme polypeptide pour désigner également une protéine ou un peptide.

Par polypeptide équivalent, on entendra désigner un polypeptide ayant au moins une des activités du récepteur LSR, notamment l'activité de récepteur de lipoprotéines ou de chylomicrons, l'activité de

récepteur de cytokine, notamment de la leptine, ou l'activité de récepteur de la protéine gC1q-R ou une de ses protéines analogues. Par polypeptide équivalent, on entendra désigner également tout polypeptide résultant 5 d'épissage alternatif de la séquence nucléique génomique codant pour les polypeptides selon l'invention.

Par polypeptide homologue, on entendra désigner les polypeptides présentant, par rapport au polypeptide naturel, certaines modifications comme en particulier 10 une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique, et/ou une mutation, notamment ponctuelle. Parmi les polypeptides homologues, on préfère ceux dont la séquence d'acides aminés présente au moins 80 %, de préférence 90 %, d'homologie avec les séquences d'acides 15 aminés des polypeptides selon l'invention.

On entendra par polypeptide variant (ou variant protéique) l'ensemble des polypeptides mutés pouvant exister, en particulier chez l'être humain, et qui correspondent notamment à des troncatures, délétions 20 et/ou additions de résidus d'amino-acides, substitutions ou mutations, notamment ponctuelles, ainsi que les polypeptides variants artificiels qui seront néanmoins appelés polypeptides variants. Dans le cas présent, les polypeptides variants seront notamment en partie 25 associés à la survenue et au développement de l'obésité ou de l'anorexie. Ils pourront aussi être associés à la survenue et/ou au développement des risques ou complications associés à l'obésité, notamment au niveau cardio-vasculaire, et/ou de pathologies associées à des 30 anomalies du métabolisme des cytokines.

Par fragment de polypeptide, on entend désigner un polypeptide ou peptide codé par une séquence nucléique comportant au minimum 10 nucléotides ou bases,

de préférence 20 bases et 30 bases. Ces fragments pourront notamment comporter une mutation ponctuelle, par comparaison à la séquence de polypeptide normal, ou correspondre à des séquences d'acides aminés spécifiques 5 de polypeptides variants, artificiels ou existant chez l'homme, tels que ceux liés à un polymorphisme lié en particulier à l'obésité ou aux pathologies citées précédemment.

Par fragment biologiquement actif, on entendra 10 désigner en particulier un fragment de séquence d'acides aminés de polypeptide :

- présentant au moins une des activités du récepteur LSR, notamment l'activité de récepteur de lipoprotéines, de récepteur à cytokine et/ou de 15 signalisation cellulaire, ou de récepteur à la protéine gC1q-R, et/ou
- capable d'être reconnu par un anticorps spécifique du récepteur selon l'invention, et/ou
- capable d'être reconnu par un composé pouvant, par 20 exemple, en neutralisant la fixation d'un ligand spécifique dudit récepteur, moduler l'activité du récepteur LSR, et/ou
- capable de moduler l'adressage et/ou la localisation cellulaire du récepteur LSR, et/ou
- 25 - et plus généralement, constituant un domaine ou motif fonctionnel du récepteur LSR.

La présente invention a également pour objet les séquences d'acide nucléique isolées, caractérisées en ce qu'elles codent pour un polypeptide selon l'invention.

30 L'invention concerne également les séquences d'acide nucléique isolées caractérisées en ce qu'elles sont choisies parmi :

- a) les séquences nucléiques selon la figure 1, la figure 3, la figure 5, la figure 7, la figure 9, la figure 31, la figure 38, la figure 39, la figure 41, la figure 43, la figure 46, la figure 47 ou la figure 48;
- 5 b) les séquences nucléiques de variant allélique de a) ;
- c) les séquences nucléiques mutées des séquences de a) ou b) ;
- d) les séquences nucléiques équivalentes des séquences de a), b) ou c) ;
- 10 e) les séquences nucléiques homologues des séquences de a), b), c) ou d), et présentant au moins 80 % d'homologie, de préférence 90 % ;
- f) les fragments de séquences nucléiques a), b), c), d) ou e) comportant au moins 10 bases ;
- 15 g) les séquences nucléiques capables de s'hybrider spécifiquement avec les séquences nucléiques a), b), c), d), e) ou f) et comportant au moins 10 bases.

De préférence, les conditions d'hybridation spécifiques seront telles que celles définies dans les 20 exemples, ou telles qu'elles assurent au moins 95 % d'homologie.

Par séquence nucléique ou d'acide nucléique, on entend un fragment d'ADN et/ou d'ARN naturel isolé, ou de synthèse, comportant ou non des nucléotides non 25 naturels, désignant un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment, un segment ou une région d'un acide nucléique.

Par séquences nucléiques équivalentes, on entend désigner les séquences nucléiques codant pour les 30 polypeptides selon l'invention, compte tenu de la dégénérescence du code génétique, les séquences d'ADN complémentaire et les séquences d'ARN correspondant,

ainsi que les séquences nucléiques codant pour les polypeptides équivalents.

Par séquences nucléiques homologues, on entend désigner les séquences nucléiques codant pour les 5 polypeptides homologues et/ou les séquences nucléiques présentant un taux d'homologie d'au moins 80 %, de préférence 90 %. Selon l'invention, l'homologie est uniquement de type statistique, elle signifie que les séquences présentent au minimum 80 %, et 10 préférentiellement 90 %, de nucléotides en commun.

On entendra par allèle ou variant allélique les séquences mutées naturelles correspondant à des polymorphismes présents chez l'être humain et, notamment, à des polymorphismes pouvant conduire à la survenue et/ou 15 au développement de l'obésité ou de l'anorexie. Ces polymorphismes pourront aussi conduire à la survenue et/ou au développement des risques ou complications associés à l'obésité, notamment au niveau cardio-vasculaire, et/ou de pathologies associées à des 20 anomalies du métabolisme des cytokines.

On entend par séquences nucléiques mutées, les séquences nucléiques comportant au moins une mutation ponctuelle par comparaison à la séquence normale.

Si les séquences selon l'invention sont en général 25 les séquences normales, ce sont également les séquences mutées dans la mesure où elles comportent au moins une mutation ponctuelle et de préférence au plus 10 % de mutations par rapport à la séquence normale.

De préférence, la présente invention concerne des 30 séquences nucléiques mutées dans lesquelles les mutations ponctuelles sont non muettes, c'est-à-dire qu'elles conduisent à une modification de l'amino-acide codé par rapport à la séquence normale. De façon encore

préférée, ces mutations portent sur des amino-acides qui structurent le complexe LSR ou les domaines et fragments correspondants de celui-ci. Ces mutations peuvent encore porter sur des amino-acides portés par les régions 5 correspondant aux sites récepteurs, aux lipoprotéines ou aux cytokines, notamment à la leptine, ou aux sites de fixation des cofacteurs, notamment de la gC1q-R ou des acides gras libres, ou encore aux sites de phosphorylation. Ces mutations peuvent également porter 10 sur les séquences impliquées dans le transport, l'adressage et l'ancrage membranaire du LSR.

De façon générale, la présente invention s'intéresse aussi bien aux polypeptides LSR normaux qu'aux polypeptides LSR mutés, ainsi qu'à leurs fragments et 15 aux séquences d'ADN et d'ARN correspondantes, les polypeptides LSR désignant les polypeptides du récepteur complexe selon l'invention.

Selon l'invention, les fragments de séquences nucléiques peuvent notamment coder pour des domaines de 20 polypeptide selon l'invention ou bien être utilisés comme sonde ou comme amorce dans des procédés de détection, d'identification ou d'amplification de séquence nucléique. Ces fragments présentent une taille minimale de 10 bases et on préférera des fragments de 20 25 bases, et de préférence 30 bases.

Les séquences nucléiques utilisables comme amorce ou sonde, caractérisées en ce que leur séquence nucléique est une séquence de l'invention, font également partie de l'invention.

30 La présente invention concerne l'ensemble des amorces qui peuvent être déduites des séquences nucléotidiques de l'invention et qui peuvent permettre de mettre en évidence lesdites séquences nucléotidiques

de l'invention, en particulier les séquences mutées, en utilisant notamment une méthode d'amplification telle que la méthode PCR, ou une méthode apparentée.

La présente invention concerne l'ensemble des sondes 5 qui peuvent être déduites des séquences nucléotidiques de l'invention, notamment des séquences capables d'hybrider avec elles, et qui peuvent permettre de mettre en évidence lesdites séquences nucléotidiques de l'invention, en particulier de discriminer les séquences 10 normales des séquences mutées.

L'ensemble des sondes et amorces selon l'invention pourront être marquées par des méthodes bien connues de l'homme du métier, afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

15 La présente invention concerne également les séquences nucléotidiques qui peuvent comporter des nucléotides non naturels, notamment des nucléotides soufrés par exemple ou de structure α ou β .

La présente invention concerne, bien entendu, aussi 20 bien les séquences ADN qu'ARN ainsi que les séquences qui s'hybrident avec elles, de même que les ADNs double brin correspondants.

L'invention comprend aussi des méthodes pour le criblage de banques d'ADNc et d'ADN génomique, pour le 25 clonage des ADNc isolés, et/ou des gènes codant pour le récepteur selon l'invention, et pour leurs promoteurs et/ou régulateurs, caractérisées en ce qu'elles mettent en oeuvre une séquence nucléique selon l'invention.

Parmi ces méthodes, on peut citer notamment :

30 - le criblage de banques d'ADNc et le clonage des ADNc isolés (Sambrook et al., 1989 ; Suggs et al., 1981 ; Woo et al., 1979), à l'aide des séquences nucléiques selon l'invention ;

- le criblage de banques d'étiquettes d'extrémités 5' (WO 96/34981) pour des séquences nucléiques selon l'invention, et ainsi l'isolement d'étiquettes permettant le clonage d'ADNc complets et des 5 promoteurs correspondants à partir de banques d'ADN génomique ;
- le criblage de banques de BACs (Chumakov et al., 1992 ; Chumakov et al., 1995) et une analyse génétique en FISH (Cherif et al., 1990) à l'aide de séquences 10 selon l'invention, permettant la localisation chromosomique, puis le séquençage complet des gènes codant pour le complexe LSR.

Est également comprise dans l'invention, la séquence d'acide nucléique génomique codant pour le récepteur 15 selon l'invention, ou un de ses variants alléliques, les séquences mutées, équivalentes ou homologues, ou un de leurs fragments, caractérisée en ce qu'elle est susceptible d'être obtenue par une des méthodes précédentes selon l'invention, ou une séquence capable 20 de s'hybrider avec lesdites séquences.

Sont également comprises dans l'invention, les séquences d'acide nucléique de promoteur et/ou de régulateur de gène codant pour le récepteur selon l'invention, ou un de leurs variants alléliques, les 25 séquences mutées, équivalentes ou homologues, ou un de leurs fragments, caractérisées en ce qu'elles sont susceptibles d'être obtenues par une des méthodes précédentes selon l'invention, ou les séquences capables de s'hybrider avec lesdites séquences.

30 Parmi les fragments nucléiques pouvant être intéressants, notamment pour le diagnostic, il faut citer par exemple les séquences génomiques introniques du gène du complexe LSR, comme notamment les séquences

jonctions entre les introns et les exons, normales ou mutées.

Les séquences d'acide nucléique utilisables comme oligonucléotides sens ou anti-sens, caractérisées en ce 5 que leurs séquences sont choisies parmi les séquences selon l'invention, font partie de l'invention.

Parmi les fragments d'acides nucléiques intéressants, il faut ainsi citer en particulier les oligonucléotides anti-sens, c'est-à-dire dont la 10 structure assure, par hybridation avec la séquence cible, une inhibition de l'expression du produit correspondant. Il faut également citer les oligonucléotides sens qui, par interaction avec des 15 protéines impliquées dans la régulation de l'expression du produit correspondant, induiront soit une inhibition, soit une activation de cette expression.

Les séquences portant des mutations pouvant intervenir dans les séquences promotrices et/ou régulatrices des gènes du complexe LSR, lesquelles 20 peuvent avoir des effets sur l'expression des protéines correspondantes, notamment sur leur niveau d'expression, font également partie des séquences précédentes selon l'invention.

Il est en effet possible, à partir des séquences 25 génomiques des gènes du complexe LSR, d'identifier les polymorphismes présents sur ces gènes, leurs promoteurs et/ou régulateurs, dans une population de sujets humains, et de façon plus spécifique de patients obèses ou atteints des pathologies mentionnées précédemment.

30 Dans ce qui va suivre, on nommera les séquences d'ADN précédentes gènes du complexe LSR, qu'il s'agisse de séquences normales ou pathologiques.

Il doit être compris que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques génomiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont 5 été isolées, c'est-à-dire qu'elles ont été prélevées directement ou indirectement, par exemple par copie (ADNc), leur environnement ayant été au moins partiellement modifié.

Ainsi, il peut s'agir aussi bien d'ADNc que d'ADN 10 génomique partiellement modifié ou porté par des séquences au moins partiellement différentes des séquences les portant naturellement.

Ces séquences pourront également être qualifiées de non naturelles.

15 L'invention comprend également les vecteurs de clonage et/ou d'expression contenant une séquence d'acide nucléique selon l'invention.

Les vecteurs selon l'invention, caractérisés en ce qu'ils comportent les éléments permettant l'expression 20 et/ou la sécrétion desdites séquences une cellule hôte, font également partie de l'invention.

Lesdits vecteurs comporteront de préférence un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction, ainsi que des régions appropriées de 25 régulation de la transcription. Ils doivent pouvoir être maintenus de façon stable dans la cellule et peuvent éventuellement posséder des signaux particuliers spécifiant la sécrétion de la protéine traduite.

Ces différents signaux de contrôle sont choisis en 30 fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences d'acide nucléique selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome

au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

Parmi les systèmes à réPLICATION autonome, on utilisera de préférence en fonction de la cellule hôte, 5 des systèmes de type plasmidique ou viral, les virus vecteurs pouvant notamment être des adénovirus (Perricaudet et al., 1992), des rétrovirus, des poxvirus ou des virus herpétiques (Epstein et al., 1992). L'homme du métier connaît les technologies utilisables pour 10 chacun de ces systèmes.

Lorsque l'on souhaitera l'intégration de la séquence dans les chromosomes de la cellule hôte, on pourra utiliser par exemple des systèmes de type plasmidique ou viral ; de tels virus seront, par exemple, les rétrovirus (Temin, 1986), ou les AAV (Carter, 1993). 15

De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par 20 exemple la lipofection, l'électroporation, le choc thermique.

L'invention comprend en outre les cellules hôtes, notamment les cellules eucaryotes et procaryotes, transformées par les vecteurs selon l'invention ainsi 25 que les mammifères, excepté l'Homme, comprenant une desdites cellules transformées selon l'invention.

Parmi les cellules utilisables à ces fins, on peut citer bien entendu les cellules bactériennes (Olins et Lee, 1993), mais également les cellules de levure 30 (Buckholz, 1993), de même que les cellules animales, en particulier les cultures de cellules de mammifères (Edwards et Aruffo, 1993), et notamment les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO), mais également les

cellules d'insectes dans lesquelles on peut utiliser des procédés mettant en oeuvre des baculovirus par exemple (Luckow, 1993). Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des protéines de l'invention est constitué 5 par les cellules CHO.

Parmi les mammifères selon l'invention, on préférera des animaux tels que les souris, les rats ou les lapins, exprimant un polypeptide selon l'invention, le phénotype correspondant au récepteur LSR normal ou variant, 10 notamment muté d'origine humaine.

Parmi les modèles animaux plus particulièrement intéressants ici, on trouve notamment :

- les animaux transgéniques présentant un déficit d'un des composants du LSR. Ils sont obtenus par 15 recombinaison homologue sur cellules souches embryonnaires, transfert de ces cellules souches à des embryons, sélection des chimères affectées au niveau des lignées reproductrices, et croissance desdites chimères ;
- 20 - les souris transgéniques surexprimant l'un ou plusieurs des gènes du complexe LSR d'origine murin et/ou humain. Les souris sont obtenues par transfection de copies multiples des gènes du complexe LSR sous contrôle d'un promoteur puissant de nature 25 ubiquitaire, ou sélectif d'un type de tissu, de préférence le foie ;
- les animaux (de préférence souris) transgéniques 30 rendus déficients pour l'un ou plusieurs des gènes du complexe LSR, par inactivation à l'aide du système LOXP/CRE recombinase (Rohlmann et al., 1996) ou de tout autre système d'inactivation de l'expression d'un gène à un âge précis de l'animal ;

- les animaux (de préférence rats, lapins, souris) surexprimant l'un ou plusieurs des gènes du complexe LSR, après transcription virale ou thérapie génique ;
- les croisements d'animaux déficients pour le LSR

5 (notamment souris), avec des animaux déficients pour, ou surexprimant :

- > le LDL récepteur (Herz et al., 1995 ; Ishibashi et al., 1993),
- > la lipase hépatique (Homanics et al., 1995 ;

10 Kobayashi et al., 1996),

- > l'apoprotéine B (Purcellhuynh et al., 1995 ; Fan et al., 1995),
- > l'apoprotéine E (Plump et al., 1992 ; Zhang et al., 1992 ; Huang et al., 1996),

15 > l'apoCIII (Aalto-Setälä et al., 1992 ; Ito et al., 1990 ; Maeda et al., 1994).

L'obtention d'animaux transgéniques, et les transfections, virales ou non virales, seront menés de façon préférée sur les lignées de rats et souris suivantes :

- rat Zucker (fa/fa) (Iida et al., 1996),
- souris AKR/J (West et al., 1992),
- souris ob/ob (Zhang et al., 1994),
- souris ob2j/ob2j (ibid),
- souris tubby (Kleyn et al., 1996 ; Nobben-Trauth et al., 1996),
- fat/fat (Heldin et al., 1995),
- souris agouti (Lu et al., 1994 ; Manne et al., 1995),
- souris db/db (Chen et al., 1996).

30 L'invention concerne également l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention comme sonde ou amorce, pour la détection et/ou l'amplification de séquence d'acide nucléique selon l'invention.

L'invention concerne également l'utilisation d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention pour la production de polypeptides recombinants ou synthétiques.

Les polypeptides obtenus par synthèse chimique et 5 pouvant comporter des amino-acides non naturels correspondant auxdits polypeptides recombinants, sont également compris dans l'invention.

Les polypeptides recombinants obtenus comme indiqué ci-dessus, peuvent aussi bien se présenter sous forme 10 glycosylée que non glycosylée et peuvent présenter ou non la structure tertiaire naturelle.

Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences d'acide nucléique définies ci-dessus, selon 15 les techniques de production de polypeptides recombinants connues de l'homme du métier. Dans ce cas, la séquence d'acide nucléique utilisée est placée sous le contrôle de signaux permettant son expression dans un hôte cellulaire.

Un système efficace de production d'un polypeptide 20 recombinant nécessite de disposer d'un vecteur et d'une cellule hôte selon l'invention.

Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans 25 des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Ces cellules sont utilisables dans une méthode de production d'un polypeptide recombinant selon 30 l'invention et peuvent également servir à titre de modèle d'analyse et de criblage.

La méthode de production d'un polypeptide de l'invention sous forme recombinante est elle-même

comprise dans la présente invention, et se caractérise en ce que l'on cultive les cellules transformées dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide recombinant de séquence d'acide nucléique selon 5 l'invention, et que l'on récupère ledit polypeptide recombinant.

Les polypeptides recombinants, caractérisés en ce qu'ils sont susceptibles d'être obtenus par ladite méthode de production, font également partie de 10 l'invention.

Les procédés de purification de polypeptide recombinant utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu 15 de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono ou polyclonaux spécifiques, etc..

20 Une variante préférée consiste à produire un polypeptide recombinant fusionné à une protéine «porteuse» (protéine chimère). L'avantage de ce système est qu'il permet une stabilisation et une diminution de la protéolyse du produit recombinant, une augmentation 25 de la solubilité au cours de la renaturation *in vitro* et/ou une simplification de la purification lorsque le partenaire de fusion possède une affinité pour un ligand spécifique.

Les anticorps mono ou polyclonaux ou leurs 30 fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, caractérisés en ce qu'ils sont capables de reconnaître spécifiquement un polypeptide ou un récepteur selon l'invention, font partie de l'invention.

Des anticorps polyclonaux spécifiques peuvent être obtenus à partir d'un sérum d'un animal immunisé contre, par exemple :

- le récepteur LSR purifié à partir de membranes de cellules présentant ledit récepteur LSR, par des méthodes bien connues de l'homme de l'art comme la chromatographie d'affinité en utilisant par exemple de la leptine recombinante comme ligand spécifique, ou
- un polypeptide selon l'invention, notamment produit par recombinaison génétique ou par synthèse peptidique, selon les modes opératoires usuels, à partir d'une séquence d'acide nucléique selon l'invention.

On notera notamment l'intérêt d'anticorps reconnaissant de façon spécifique certains polypeptides équivalents, variants, ou fragments, notamment biologiquement actifs, selon l'invention.

Les anticorps monoclonaux spécifiques peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein, 1975.

Les anticorps selon l'invention sont, par exemple, des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab ou F(ab')2. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

L'invention concerne également des méthodes pour la détection et/ou la purification d'un polypeptide selon l'invention, caractérisées en ce qu'elles mettent en œuvre un anticorps selon l'invention.

L'invention comprend en outre des polypeptides purifiés, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par une méthode selon l'invention.

Par ailleurs, outre leur utilisation pour la purification des polypeptides, les anticorps de l'invention, en particulier les anticorps monoclonaux, peuvent également être utilisés pour la détection de ces 5 polypeptides dans un échantillon biologique.

Ils constituent ainsi un moyen d'analyse immuno-cytochimique ou immunohistochimique de l'expression de polypeptide du récepteur LSR sur des coupes de tissus spécifiques, par exemple par immunofluorescence, 10 marquage à l'or, immunoconjugués enzymatiques.

Ils permettent notamment de mettre en évidence une expression anormale de ces polypeptides dans les tissus ou prélèvements biologiques, ce qui les rend utiles pour la détection d'expression anormale du récepteur LSR ou 15 pour le suivi de l'évolution de méthode de prévention ou de traitement.

Plus généralement, les anticorps de l'invention peuvent être avantageusement mis en oeuvre dans toute situation où l'expression d'un polypeptide de récepteur 20 LSR doit être observée.

Font également partie de l'invention, les méthodes de détermination d'une variabilité allélique, d'une mutation, d'une délétion, d'une perte d'hétérozygotie ou d'une anomalie génétique, caractérisées en ce qu'elles 25 mettent en oeuvre une séquence d'acide nucléique selon l'invention.

Ces méthodes de diagnostic visent par exemple les méthodes de diagnostic de prédisposition à l'obésité, aux risques associés, ou aux pathologies associées à des 30 anomalies du métabolisme des cytokines, en déterminant à partir d'un prélèvement biologique du patient la présence de mutations dans au moins une des séquences décrites précédemment. Les séquences d'acides nucléiques

analysées pourront aussi bien être de l'ADN génomique, de l'ADNc, ou de l'ARNm.

Les outils d'acides nucléiques basés sur la présente invention pourront également permettre un diagnostic 5 positif et différentiel chez un malade pris isolément. Ils seront de préférence utilisés pour un diagnostic pré-symptomatique chez un sujet à risque, notamment avec antécédent familial. Il est également possible de prévoir un diagnostic anté-natal.

10 En outre, la mise en évidence d'une mutation spécifique peut permettre un diagnostic évolutif, notamment quant à l'intensité de la pathologie ou à l'époque probable de son apparition.

15 Les méthodes permettant de mettre en évidence la mutation dans un gène par rapport au gène naturel sont, bien entendu, très nombreuses. On peut essentiellement les diviser en deux grandes catégories. Le premier type de méthode est celui dans lequel la présence d'une mutation est détectée par comparaison de la séquence 20 mutée avec la séquence correspondante naturelle non mutée, et le second type est celui dans lequel la présence de la mutation est détectée de façon indirecte, par exemple par évidence de misappariements dus à la présence de la mutation.

25 Parmi les méthodes de détermination d'une variabilité allélique, d'une mutation, d'une délétion, d'une perte d'hétérozygotie ou d'une anomalie génétique, on préfère les méthodes comprenant au moins une étape d'amplification dite par PCR (réaction en chaîne par la 30 polymérase) ou par PCR-like de la séquence cible selon l'invention susceptible de présenter une anomalie à l'aide de couple d'amorces de séquences nucléotidiques selon l'invention. Les produits amplifiés pourront être

traités à l'aide d'enzyme de restriction approprié avant de procéder à la détection ou au dosage du produit ciblé.

Par PCR-like on entendra désigner toutes les méthodes mettant en oeuvre des reproductions directes ou indirectes des séquences d'acides nucléiques, ou bien dans lesquelles les systèmes de marquage ont été amplifiés, ces techniques sont bien entendu connues, en général il s'agit de l'amplification de l'ADN par une polymérase ; lorsque l'échantillon d'origine est un ARN il convient préalablement d'effectuer une transcription réverse. Il existe actuellement de très nombreux procédés permettant cette amplification, par exemple les méthodes dites NASBA «Nucleic Acid Sequence Based Amplification» (Compton, 1991), TAS «Transcription based Amplification System» (Guatelli et al., 1990), LCR «Ligase Chain Reaction» (Landegren et al., 1988), «Endo Run Amplification» (ERA), «Cycling Probe Reaction» (CPR), et SDA «Strand Displacement Amplification» (Walker et al., 1992), bien connues de l'homme du métier.

L'invention comprend en outre les méthodes de diagnostic de pathologies et/ou de pathogénies corrélées à une expression anormale de polypeptide et/ou de récepteur selon l'invention, caractérisées en ce que l'on met en contact un anticorps selon l'invention avec le matériel biologique à tester, dans des conditions permettant la formation éventuelle de complexes immunologiques spécifiques entre ledit polypeptide et ledit anticorps et en ce que l'on détecte les complexes immunologiques éventuellement formés.

Les mutations d'un ou des gène(s) du complexe LSR peuvent être responsables de différentes modifications

de leur(s) produit(s), modifications utilisables pour une approche diagnostique. En effet, les modifications d'antigénicité peuvent permettre la mise au point d'anticorps spécifiques. La discrimination des 5 différentes conformations du LSR peut être réalisée par ces méthodes. Toutes ces modifications peuvent être utilisées dans une approche diagnostique grâce à plusieurs méthodes bien connues basées sur l'utilisation d'anticorps mono ou polyclonaux reconnaissant le 10 polypeptide normal ou des variants mutés, comme par exemple par RIA ou par ELISA.

Ces méthodes de diagnostic visent également les méthodes de diagnostic par imagerie *in vivo* ou *ex vivo* en utilisant les anticorps monoclonaux ou polyclonaux 15 selon l'invention, particulièrement ceux marqués et correspondant à tout ou partie des polypeptides mutés (imagerie à l'aide d'anticorps couplés à une molécule détectable en imagerie de type PET-scan, par exemple).

L'invention concerne également l'utilisation de 20 cellules, de mammifère ou de polypeptide selon l'invention, pour l'étude de l'expression et de l'activité du récepteur selon l'invention, et des interactions directes ou indirectes entre ledit récepteur et des composés chimiques ou biochimiques 25 pouvant être impliqués dans l'activité dudit récepteur.

L'invention concerne également l'utilisation de cellule, de mammifère ou de polypeptide selon l'invention, pour le criblage de composé chimique ou biochimique pouvant interagir directement ou 30 indirectement avec le récepteur selon l'invention, et/ou capable de moduler l'expression ou l'activité dudit récepteur.

Sont également comprises dans l'invention, les méthodes de sélection de composé chimique ou biochimique capable d'interagir, directement ou indirectement avec le récepteur selon l'invention, et/ou permettant de 5 moduler l'expression ou l'activité dudit récepteur, caractérisées en ce qu'elles mettent en oeuvre une cellule, un mammifère ou un polypeptide selon l'invention.

Les composés chimiques ou biochimiques, caractérisés 10 en ce qu'il sont capables d'interagir, directement ou indirectement, avec le récepteur selon l'invention, font partie de l'invention.

Les composés chimiques ou biochimiques, caractérisés 15 en ce qu'ils permettent de moduler l'expression ou l'activité du récepteur selon l'invention, font également partie de l'invention.

Les composés chimiques ou biochimiques caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés par lesdites méthodes définies ci-dessus font également partie de l'invention.

20 En particulier, parmi ces composés selon l'invention, on préfère une leptine ou un de ses composés dérivés, de préférence un de ses variants protéiques, ou des leptines modifiées chimiquement ou obtenues par recombinaison génétique, ou un de leurs 25 fragments.

Les cellules ou mammifères transformés tels que décrits précédemment pourront également être utilisés à titre de modèles afin d'étudier les interactions entre les polypeptides du complexe LSR, entre ceux-ci et leurs 30 partenaires, composés chimiques ou protéiques, impliqués directement ou indirectement dans les activités de récepteur aux lipoprotéines ou de récepteur aux cytokines, et notamment à la leptine, et afin d'étudier

les différents mécanismes et interactions mis en jeu selon le type d'activité, ou selon qu'il s'agit d'un complexe normal, ou dont l'un au moins des domaines est un variant.

5 Surtout, ils pourront être utilisés pour la sélection de produits interagissant avec le complexe LSR, ou l'un de ses domaines, normal(aux) ou variant(s), à titre de cofacteur, ou d'inhibiteur, notamment compétitif, ou encore ayant une activité agoniste ou 10 antagoniste sur les changements conformationnels du complexe LSR. De préférence, on utilisera lesdites cellules transformées à titre de modèle permettant, notamment, la sélection de produits permettant de lutter contre l'obésité ou les pathologies mentionnées ci- 15 dessus. Lesdites cellules pourront encore servir pour la mise en évidence des risques potentiels présentés par certains composés.

On entend désigner par composés permettant de moduler l'expression ou l'activité du récepteur, les 20 composés qui permettent notamment de réduire, de stabiliser ou d'augmenter le nombre, la vitesse de recyclage et/ou le changement de conformation du récepteur selon l'invention, ou, de favoriser ou d'inhiber l'activité globale ou l'activité d'un des 25 domaines dudit récepteur ou encore de rétablir l'expression normale dudit récepteur dans le cas, par exemple, où une anomalie génétique est constatée. Ces composés pourront par exemple interagir en tant que ligands spécifiques dudit récepteur ou d'un de ses 30 domaines à titre de cofacteur, ou d'inhibiteur, notamment compétitif, ou encore ayant une activité agoniste ou antagoniste sur les changements conformationnels du complexe. Ces composés pourront

également interagir en neutralisant les ligands spécifiques naturels dudit récepteur et en inhibant ainsi l'activité du récepteur induite par ces ligands.

5 Parmi ces composés, on préfère les composés permettant de moduler le nombre de polypeptides dudit récepteur, sa vitesse de recyclage et/ou la sélectivité de leur activité.

10 Sont également préférés les composés selon l'invention, caractérisés en ce qu'ils permettent une augmentation de l'activité totale ou de l'expression du récepteur selon l'invention, et/ou une augmentation spécifique de l'activité de clairance aux cytokines, notamment à la leptine, dudit récepteur, et/ou une augmentation spécifique de l'activité de clairance aux 15 lipoprotéines, dudit récepteur.

On préfère également les composés caractérisés en ce qu'ils permettent une diminution de l'activité totale ou de l'expression du récepteur selon l'invention, et/ou une diminution spécifique de l'activité de clairance aux 20 cytokines, notamment à la leptine, dudit récepteur, et/ou une diminution spécifique de l'activité de clairance aux lipoprotéines, dudit récepteur.

25 Egalement préférés sont les composés caractérisés en ce qu'ils permettent une modulation de l'élimination des cytokines, notamment de la leptine, et/ou une modulation de l'élimination des lipoprotéines, des résidus de chylomicrons, et/ou des triglycérides.

30 L'invention comprend également les composés selon l'invention, caractérisés en ce qu'ils permettent une modulation du taux de cytokines, notamment de la leptinémie, et/ou une modulation du taux des lipoprotéines, des résidus de chylomicrons, et/ou des triglycérides.

On préfère plus particulièrement les composés selon l'invention, caractérisés en ce qu'ils permettent un contrôle du taux de cytokines, notamment de la leptinémie.

5 De façon également préférée, l'invention comprend les composés selon l'invention, caractérisés en ce qu'ils permettent un contrôle, de préférence une diminution, du taux de lipoprotéines, une diminution de la concentration plasmatique de résidus de chylomicrons, 10 et/ou une diminution de la triglycéridémie.

Parmi les composés les plus préférés, on préfère ceux, caractérisés en ce qu'ils sont choisis parmi :

- a) un anticorps selon l'invention ;
- b) un polypeptide selon l'invention ;
- 15 c) un polypeptide selon l'invention, caractérisé en ce qu'il correspond à une forme soluble du récepteur selon l'invention ;
- d) le composé C1q, un de ses composés analogues, un de ses variants ou un de leurs fragments ;
- 20 e) la protéine gC1q-R, une de ses protéines analogues, un de ses variants ou un de leurs fragments ;
- f) un vecteur selon l'invention ;
- g) un vecteur selon l'invention, caractérisé en ce qu'il présente à sa surface extérieure un site de 25 reconnaissance spécifique des cellules hépatiques ;
- h) un vecteur selon l'invention, caractérisé en ce que le produit d'expression de l'acide nucléique inséré par le vecteur dans la cellule cible, est, soit ancré dans ou soit excrété par ladite cellule cible 30 transformée ;
- i) un oligonucléotide sens ou anti-sens selon l'invention ;

j) une leptine, ou un de ses variants protéiques, ou une leptine modifiée chimiquement ou par recombinaison génétique, ou un de leurs fragments.

5 L'invention concerne enfin les composés selon l'invention à titre de médicament.

On préfère notamment les composés selon l'invention à titre de médicament pour la prévention et/ou le traitement de pathologies et/ou de pathogénies liées aux troubles du comportement alimentaire.

10 On préfère également les composés selon l'invention à titre de médicament pour la prévention et/ou le traitement de pathologies et/ou de pathogénies liées aux troubles du métabolisme des cytokines.

15 De façon préférée, l'invention concerne également les composés selon l'invention à titre de médicament pour la prévention ou le traitement de l'obésité ou de l'anorexie.

20 Les composés selon l'invention, à titre de médicament pour la prévention et/ou le traitement de pathologies et/ou de pathogénies associées à, ou induites par l'obésité, sont les composés préférés.

25 En particulier, on préfère les composés selon l'invention, à titre de médicament pour la prévention et/ou le traitement de l'insuffisance cardiaque, de l'insuffisance coronarienne, des accidents vasculaires cérébraux, de la maladie athéromateuse, de l'athérosclérose, de l'hypertension artérielle, du diabète non insulino-dépendant, de l'hyperlipidémie et/ou de l'hyper-uricémie.

30 Les plus préférés sont les composés selon l'invention, à titre de médicament pour la prévention et/ou le traitement de la maladie athéromateuse et/ou de l'athéro-sclérose.

Enfin, l'invention comprend des composés selon l'invention pour la prévention et/ou le traitement par thérapie génique, de pathologies et/ou de pathogénies liées aux troubles du comportement alimentaire, de 5 l'obésité et/ou de pathologies et/ou de pathogénies associées à, ou induites par, l'obésité.

Les composés de l'invention en tant que principes actifs de médicament, seront préférentiellement sous forme soluble, associés à un véhicule pharmaceutiquement 10 acceptable.

De tels composés utilisables à titre de médicament offrent une nouvelle approche pour prévenir et/ou traiter les pathologies et/ou pathogénies liées aux troubles du comportement alimentaire telles que 15 l'obésité ou l'anorexie, et les risques et/ou complications associés.

De préférence, ces composés seront administrés par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique ou par voie 20 orale.

Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un patient 25 comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés, etc..

Comme mentionné précédemment, selon les cas, il pourra convenir d'amplifier l'activité du LSR, en 30 promouvant par exemple l'expression de ses gènes ou en augmentant l'activité de leurs produits d'expression, dans les cas pathologiques provenant du fait que l'un au moins de ces gènes n'est pas exprimé, insuffisamment

exprimé ou exprimé sous une forme anormale qui ne permet pas au produit d'expression de remplir ses fonctions, ou au contraire de réprimer une surexpression, ou une expression anormale de ces gènes. Il convient donc de 5 pallier de façon générale la carence ou la surexpression de produits d'expression de ce gène par une thérapie dite « de remplacement » permettant l'amplification ou la diminution des activités du complexe LSR.

La thérapie de remplacement pourra être effectuée 10 par thérapie génique, c'est-à-dire en introduisant les séquences d'acide nucléique selon l'invention et/ou les gènes correspondants avec les éléments qui permettent leur expression *in vivo*, dans le cas où l'un des gènes est insuffisamment exprimé par exemple, ou bien 15 lorsqu'il est exprimé sous une forme anormale.

Les principes de la thérapie génique sont connus. On peut utiliser des vecteurs viraux selon l'invention ; il est également possible de prévoir des vecteurs non 20 viraux, c'est-à-dire synthétiques, qui miment des séquences virales ou bien qui sont constitués par de l'ADN ou de l'ARN nu selon la technique développée notamment par la société VICAL.

Dans la plupart des cas, il faudra prévoir des éléments de ciblage assurant une expression spécifique 25 du foie de façon à pouvoir limiter les zones d'expression des protéines qui restent impliquées dans la clairance de la leptine et celle des lipoprotéines. Il est même intéressant, dans certains cas, d'avoir des vecteurs d'expression transitoire ou au moins 30 d'expression contrôlée que l'on pourra bloquer lorsque cela sera nécessaire.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description

avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

Légendes des figures

5

FIGURE 1 : Séquence nucléique de l'ADNc de rat LSR-Rn-2097.

FIGURE 2 : Séquence peptidique de la protéine LSR 66 de rat.

10 **FIGURE 3** : Séquence nucléique de l'ADNc de rat LSR-Rn-2040.

FIGURE 4 : Séquence peptidique de la protéine LSR 64 de rat.

15 **FIGURE 5** : Séquence nucléique de l'ADNc de rat LSR-Rn-1893.

FIGURE 6 : Séquence peptidique de la protéine LSR 58 de rat.

FIGURE 7 : Séquence nucléique de l'ADNc humain LSR-Hs-2021.

20 **FIGURE 8** : Séquence peptidique de la protéine LSR humaine de 643 acides aminés.

FIGURE 9 : Séquence nucléique de l'ADNc humain LSR-Hs-1817.

FIGURE 10 : Séquence peptidique de la protéine LSR humaine de 575 acides aminés.

FIGURE 11 : Identification du récepteur LSR par ligand et Western blotting.

5 Le ligand blotting est réalisé sur des protéines solubilisées de membranes de foie de rat (35-50 mg de protéine par gel). Après électrotransfert d'une partie du gel, les bandelettes de nitrocellulose sont incubées en absence (ligne 1) ou en présence (ligne 2) de 800 μ M
10 d'oléate et de 125 I-LDL. Les trois bandes identifiées comme responsables de l'activité LSR sont caractérisées par un poids moléculaire apparent de 240 kDa, 115 kDa et 90 kDa (ligne 2).

La protéine correspondant à 240 kDa est ensuite
15 purifiée par électroélution du gel de polyacrylamide. La ligne 3 présente le résultat d'un ligand blotting effectué dans les mêmes conditions sur la protéine de 240 kDa ainsi partiellement purifiée (80 μ g/ligne).

La ligne 4 présente le résultat d'un Western blotting conduit sur une préparation similaire de protéines solubilisées de membranes de foie de rat, utilisant des anticorps anti-LSR comme premiers anticorps et des anticorps de chèvre anti-IgG de lapin marqués à l'iode 125 I comme seconds anticorps.

25 **FIGURE 12 :** Effet d'anticorps anti-LSR sur l'activité LSR de membranes plasmiques ou de cultures primaires d'hépatocytes de rat.

A. On mesure la fixation d' 125 I-LDL, induite par l'oléate, sur les membranes plasmiques d'hépatocytes de
30 rat, en présence de concentrations croissantes d'anticorps anti-LSR (v) ou d'un anticorps contrôle (o).

Les résultats sont représentés en % de la quantité totale d' ^{125}I -LDL fixée en absence d'anticorps.

B. On mesure la fixation, l'incorporation et la dégradation de l' ^{125}I -LDL, induite par l'oléate, dans des

hépatocytes en culture primaire, en présence d'anticorps anti-LSR (v) ou d'un anticorps contrôle (o). Les résultats sont représentés en % de fixation, incorporation et dégradation totale d' ^{125}I -LDL induite par l'oléate en présence d'anticorps non spécifiques.

FIGURE 13 : Identification du récepteur LSR par immuno-précipitation de lysats d'hépatocytes.

Les lysats d'hépatocytes marqués à la ^{35}S méthionine et cystéine sont immunoprecipités en présence d'anticorps contrôle (ligne 1), ou d'anticorps anti-LSR (lignes 2 à 4). Les immunoprecipités sont séparés sous conditions non dénaturantes (lignes 2 - sans incubation à 100°C -, et 3 - avec incubation de 5 minutes à 100°C) ou sous conditions réduites en présence de 5 % de β -mercaptoéthanol (ligne 1,4) sur gels de polyacrylamide à 10 % de SDS.

FIGURE 14 : Clonage du c-DNA codant pour le LSR α et β .

A. Analyse en Northern blot montrant plusieurs tailles de l'ARN messager de LSR ; la sonde utilisée correspond au fragment BgIII-XbaI issu du cDNA de LSR ; l'hybridation a été conduite sur 2 μg d'ARNm poly(A)+ de foie de rat.

B. Analyse en Northern blot multi-tissulaire de l'ARNm de LSR ; 2 μg d'ARNm poly(A)+ de différents tissus (Clontech) ont été hybridés avec une sonde correspondant au fragment XbaI-XbaI issu du cDNA de LSR, puis ré-hybridés avec une sonde contrôle de β -actine.

C. Analyse de l'ARNm du LSR en RT-PCR utilisant 5 couples d'amorces couvrant la séquence entière. Les résultats montrent que seul le couple bc' permet d'amplifier trois bandes. Les produits de PCR de ces trois bandes ont été clonés et séquencés. Le schéma

représente les résultats d'analyse de séquence des trois formes d'ADNc de LSR : la région quadrillée est absente des deux formes courtes, la région hachurée est absente uniquement de la forme la plus courte. Les séquences des 5 oligonucléotides utilisés sont listées ci-dessous :

- a : 5' - GTTACAGAATTGCCGCGATGGCGCCGGCG - 3'
- b : 5' - GCCAGGACAGTGTACGCCT - 3'
- c : 5' - ACCTCAGGTGTCCCGAGCAT - 3'
- d : 5' - GAAGATGACTGGCGATCGAG - 3'
- 10 • e : 5' - ACCTCTATGACCCGGACGAT - 3'
- b' : 5' - CACCACCCCTGACAGTGCCTA - 3'
- c' : 5' - CTGGGGGCATAGATGCTCGG - 3'
- d' : 5' - GCCCTGGAAGGCCTCGATCG - 3'
- e' : 5' - CAAGTCCCTAGGATCGTCCG - 3'
- 15 • f' : 5' - CGTCACGAATTCCGTGGATCAGACGTC - 3'.

FIGURE 15 : Traduction in vitro des deux cDNAs complets codant pour les formes la plus longue (66 kDa) et la plus courte (58 kDa) de LSR.

Les produits de traduction in vitro, marqués à la 20 35S-méthionine, sont analysés après électrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide (10 %), en conditions non réduites. La ligne 1 montre le produit de traduction obtenu à partir du plasmide portant un anti-sens du cDNA codant pour LSR 66, la ligne 2 celui obtenu par traduction du plasmide portant un cDNA codant pour LSR 25 66, et la ligne 3 celui obtenu à partir du plasmide portant un cDNA codant pour LSR 58.

FIGURE 16 : Identification des sous-unités LSR α et β comme responsables de l'activité LSR.

30 A. Effet d'anticorps dirigés contre un peptide LSR synthétique sur l'activité LSR de membranes plasmiques

de foie de rat. L'activité LSR est mesurée en présence de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'un anticorps contrôle (o) ou de l'anticorps anti-peptide LSR (v).

5 B. Western et Ligand blotting des sous-unités α et β du LSR. Le western blotting est conduit en utilisant comme premier anticorps l'anti-LSR (ligne 1) ou l'anti-peptide LSR (ligne 2). Le ligand blotting est conduit en présence de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d' ^{125}I -LDL, avec (ligne 3) ou sans (ligne 4) oléate (0.8 mM).

10 **FIGURE 17 :** Représentation schématique des trois formes de la protéine LSR.

15 Les motifs remarquables, décrits en Exemple 2, de LSR 66 sont représentés ; les séquences absentes de LSR 64 et de LSR 58 sont également indiquées sur la même figure.

FIGURE 18 : Effet de l'oléate, de RAP-39, des anticorps anti-LSR et de la chloroquine sur la dégradation spécifique de la leptine dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat.

20 Les cellules primaires d'hépatocytes de rat sont incubées pendant 4 heures à 37°C avec 20 ng/ml de ^{125}I -leptine en absence ou en présence de 0,5 mM d'oléate, de 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de RAP, de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'anticorps non spécifiques ou anti-LSR spécifiques, ou de 50 μM de 25 chloroquinine. On récupère ensuite le milieu et on mesure la quantité de ^{125}I -leptine dégradée.

30 **FIGURE 19 :** Analyse en Western blotting utilisant les anticorps anti-LSR, de la fraction des protéines de membrane plasmique de foie de rat retenue sur colonne de chromatographie d'affinité contenant de la leptine.

FIGURE 20 : Clairance de la ^{125}I -leptine sur des souris témoins, ob/ob et db/db.

Les souris témoins (o), ob/ob (v), db/db (ψ), sont anesthésiées, et une injection intraveineuse (par la veine saphène) de 80 ng de ^{125}I -leptine, ou ^{125}I - β 2-microglobuline leur est administrée. Après 5 minutes, on 5 effectue une perfusion de solution saline physiologique (à 4°C), les tissus sont prélevés, et la radioactivité qui s'y trouve est comptée. Les résultats sont exprimés comme la différence entre les quantités de ^{125}I -leptine

et de ^{125}I - β 2-microglobuline, retrouvées dans le foie et dans le rein.

FIGURE 21 : Nombre apparent de récepteurs LSR exprimés dans le foie de souris témoins, ob/ob et db/db.

5 Les membranes plasmiques d'hépatocytes sont préparées (Bartles et Hubbard, 1990) puis le nombre apparent de récepteurs LSR est mesuré comme décrit précédemment (Mann et al., 1995). Chaque résultat représente la moyenne obtenue sur 3 mesures par animal
10 pour 3 animaux différents dans chacun des groupes.

FIGURE 22 : Effet des anticorps anti-LSR sur la proportion de ^{125}I -leptine distribuée dans le foie comparé au rein.

On anesthésie des souris témoins puis on leur
15 injecte par intraveineuse 1 mg d'anticorps IgG non spécifiques ou d'anticorps IgG anti-LSR. Après 30 minutes, on injecte 80 ng de ^{125}I -leptine suivi, après 5 minutes, d'une perfusion de solution saline physiologique à 4°C. On prélève immédiatement les tissus
20 et on mesure la radioactivité. Les résultats représentent la moyenne et la déviation standard obtenues pour 3 animaux pour chacun des groupes.

FIGURE 23 : Effet de la leptine sur l'activité LSR de culture primaire d'hépatocytes de rat.

25 Les hépatocytes de rat en culture primaire sont incubés à 37°C pendant 30 min. avec une concentration croissante de leptine, puis incubés à 37°C pendant 4 heures avec soit 50 $\mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -LDL (activité spécifique : 209 cpm/ng) (o) ou soit 50 $\mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -VLDL (activité spécifique : 157 cpm/ng (v) en absence ou
30 en présence de 500 μM d'oléate. On lave ensuite les cellules et on mesure les quantités de ^{125}I -lipoprotéines

fixées, incorporées et dégradées comme décrit précédemment (Bihain et Yen, 1992). Les résultats

représentent les différences obtenues entre les cellules incubées avec ou sans oléate. Chaque point représente la moyenne de 3 mesures. La déviation standard de chaque point est comprise dans le symbole.

5 **FIGURE 24** : Capacité d'induction par la leptine de l'activité LSR d'hépatocytes de rat en culture primaire.

A. Augmentation du nombre apparent de récepteurs exprimés à la surface des hépatocytes, en présence de 20 ng/ml leptine. Les cultures primaires d'hépatocytes 10 de rat sont incubées pendant 30 min à 37°C en présence ou absence de 20 ng/ml de leptine, 10 min à 37°C en présence de 0,8 mM d'oléate. Les cellules sont lavées avec du tampon PBS pré-refroidi à 4°C, puis incubées 2 heures à 4°C en présence de concentrations croissantes 15 de ^{125}I -LDL. Les cellules sont ensuite lavées, lysées et on mesure la quantité de ^{125}I -LDL fixée.

B. Effet de la cycloheximide, de la colchicine et de la cytochalasine B sur l'induction par la leptine de l'activité LSR.

20 Les conditions initiales sont identiques à celles décrites en A. ; après incubation avec la leptine, on incube les cellules pendant 30 min à 37°C avec 5 μM de cycloheximide, 5 μM de colchicine ou 2,5 μM de cytochalasine B. Les cellules sont ensuite incubées 10 min à 25 37°C en présence de 0,8 mM d'oléate. Les cellules sont alors lavées avec du tampon PBS pré-refroidi à 4°C, puis incubées 2 heures à 4°C en présence de 50 $\mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -LDL.

30 Les résultats représentent la moyenne obtenue pour 2 mesures.

FIGURE 25 : Effet de la leptine sur la réponse lipidique post-prandiale sur des souris témoins, ob/ob et db/db.

Des souris contrôles (0), ob/ob (v) et db/db (o) à jeun depuis la veille, sont gavées avec un repas très riche en graisse. Immédiatement après le repas (temps =

0 heure), on injecte par intraveineuse aux souris, soit 200 μ l de solution saline physiologique (panel A), soit 200 μ l d'une même solution contenant 50 μ g de leptine recombinante murine (panel B). La réponse triglycéridémique est ensuite mesurée. Chaque point de la courbe représente la moyenne avec écart-type obtenue pour 3 mesures par animal et pour 3 animaux différents.

5 **FIGURE 26 :** Effet de la lactoferrine et/ou de la leptine sur la PLR de souris ob/ob.

10 Des souris ob/ob, à jeun depuis la veille, sont gavées avec un repas identique à celui décrit pour la figure 15. Immédiatement après le repas (temps = 0 heure), on injecte aux souris par intraveineuse 200 μ l de solution saline contenant soit aucun supplément, soit 15 0,5 μ g de leptine, soit 2,5 mg de lactoferrine ou soit un mélange de 0,5 μ g de leptine et de 2,5 mg de lactoferrine. Le sang est prélevé entre 2 et 3 heures après le repas et la concentration plasmatique en triglycérides (TG) est mesurée. Les valeurs obtenues 20 représentent la moyenne avec écart-type obtenue pour 4 mesures par animal et pour 2 animaux différents [p < 0,02 (ob/ob comparé à ob/ob + leptine), p < 0,01 (ob/ob comparé à ob/ob + lactoferrine), NS (ob/ob + lactoferrine comparé à ob/ob + leptine + lactoferrine)].

25 **FIGURE 27 :** Effet de l'injection de leptine sur le nombre apparent de récepteurs LSR exprimés dans le foie de souris ob/ob et db/db.

La leptine est injectée à des souris ob/ob et db/db par la veine saphène. Après 30 min, on prépare les 30 membranes plasmiques de cellules de foie puis on mesure le nombre de récepteurs LSR comme décrit précédemment (Mann et al., 1995). Les résultats représentent la

moyenne et la déviation standard de 6 mesures effectuées pour chacun des phénotypes.

5 **FIGURE 28** : Effet inhibiteur d'anticorps dirigés contre deux peptides différents synthétisés d'après la séquence peptidique de la protéine gC1q-R, sur l'activité LSR de membranes plasmiques d'hépatocytes de rat.

On mesure la fixation d' ^{125}I -LDL, induite par l'oléate, sur les membranes plasmiques d'hépatocytes de rat, en présence de concentrations croissantes 10 d'anticorps dirigés contre un peptide NH₂ terminal de gC1q-R (v), contre un peptide COOH-terminal de gC1q-R (o) ou d'un anticorps contrôle (o). Les résultats sont représentés en % de la quantité totale d' ^{125}I -LDL fixée en absence d'anticorps.

15 **FIGURE 29** : Effet de concentrations croissantes de C1q sur la fixation, l'internalisation et la dégradation de ^{125}I -LDL sur les hépatocytes, en présence ou en absence d'oléate.

Des cultures primaires d'hépatocytes de rat sont 20 incubées avec 20 ng de leptine/puits pendant 30 min à 37°C ; on ajoute ensuite des concentrations croissantes de C1q et 20 $\mu\text{g/ml}$ de ^{125}I -LDL, avec ou sans 0,5 mM d'oléate. Les cellules sont ensuite incubées pendant 4 h à 37°C ; on analyse enfin la fixation, l'internalisation 25 et la dégradation de ^{125}I -LDL. Les résultats sont représentés en ng de ^{125}I -LDL fixées, internalisées, et dégradées par boîte en présence (v) ou absence (o) d'oléate.

FIGURE 30 : Composés analogues de C1q.

30 Les domaines globulaires de protéines appartenant à la famille du complément C1q ont été alignés en

utilisant clustalW. Les différentes séquences alignées sont :

- C1qa-117 : séquence protéique du complément C1q A (référence Swiss Prot : P02745), à partir de l'acide 5 aminé en position 117.

- C1qb-122 : séquence protéique du complément C1q B (référence Swiss Prot : P02746), à partir de l'acide aminé en position 122.
- C1qc-121 : séquence protéique du complément C1q C (référence Swiss Prot : P02747), à partir de l'acide aminé en position 121.
- mult-1160 : séquence protéique traduite de la séquence nucléique de la multimérisine (GenBank, Accession : U27109) à partir de l'acide aminé 1160.
- cer-64 : séquence protéique traduite de la séquence nucléique de la cérebeline (GenBank, Accession : M58583) à partir de l'acide aminé 64.
- apm1-115 : séquence protéique traduite de la séquence nucléique de apM1 (GenBank, Accession : D45371) à partir de l'acide aminé 115.
- adQ-118 : séquence protéique traduite de la séquence nucléique de AdipoQ (GenBank, Accession : U49915) à partir de l'acide aminé 118.
- acrp-118 : séquence protéique traduite de la séquence nucléique de acrp30 (GenBank, Accession : U37222) à partir de l'acide aminé 118.

Les encadrés montrent les deux portions de l'alignement des séquences correspondant à la signature C1q, le premier correspondant au consensus déposé dans la base de donnée Prosite (#PDOC00857) : F-x(5)-[ND]-x(4)-[FYWL]-x(6)-F-x(5)-G-x-Y-x-F-x-[FY], le second à l'extrémité COOH des protéines est : [ST]-x-F-[ST]-G-[FY]-L-[LV]-[FY].

Les flèches (V) au-dessus des alignements marquent les positions des résidus Cystéines conservés dans les trois formes de C1q mais non dans les autres protéines alignées.

Les symboles (*) placés sous les alignements indiquent les acides aminés conservés, les symboles (.) indiquent les substitutions conservatives d'acides aminés.

5 **FIGURE 31 :** Séquence génomique du gène LSR humain.

La séquence génomique du LSR humain comprend 2000 paires de bases en amont du site d'initiation de la traduction et 1007 paires de base en aval site de polyadénylation. Les exons ont été déterminés en alignant les séquences de LSR-Rn-2097 et de lisch7 de souris avec la séquence génomique humaine. Dans la séquence génomique humaine, le premier exon commence au site d'initiation de la traduction. Les sites d'épissage sont indiqués dans la figure et dans le tableau ci-dessous. La conservation de la phase ouverte de lecture a été recherchée. Le tableau ci-dessous récapitule les principales caractéristiques de cette séquence.

- Description des exons.

20

EXON	DEBUT	FIN	5' Epis.	BL 5'	3' Epis.	BL 3'
Ex1	>2001	2245	none	---	GTGCAC	+ 2
Ex2	3447	3781	CAG	+ 1	GTATGT	+ 1
Ex3	12067	12186	CAG	+ 2	GTGAGT	+ 1
Ex4	15047	15103	CAG	+ 2	GTACGG	+ 1
Ex5	15668	15814	CAG	+ 2	GTAAGT	+ 1
Ex6	19481	19654	CAG	+ 2	GTGAGG	+ 1
Ex7	19801	19860	CAG	+ 2	GTGAGA	+ 1
Ex8	19958	20089	TAG	+ 2	GTAAGC	+ 1
Ex9	20231	20856	CAG	+ 2	GTGAGG	0
Ex10	20946	<20978	CAG	0	-----	

La colonne EXON indique les exons numérotés de 1 à 10 dans l'ordre 5'-3' de leur détermination sur la séquence génomique. Les colonnes DEBUT et FIN indiquent la 5 position du premier et du dernier nucléotide de l'exon considéré. Dans les colonnes 5' Epis. et 3' Epis. sont

indiquées les séquences du site d'épissage bordant l'exon en 5' et 3'. Les colonnes BL 5' et BL 3' indiquent le nombre de bases respectivement en 5' et en 3' d'un exon qui ne seront engagées dans la phase 5 ouverte de lecture du messager qu'après l'épissage. Par exemple : l'exon 7 a une base libre en 3', cet exon peut être joint à l'extrémité 5' de l'exon 8 qui a 2 bases libres en 5', l'ensemble 1 base + 2 bases reconstitue le codon qui était détruit par l'intron dans la séquence 10 génomique. Remarquons que l'exon 7 peut très bien être rabouté par son extrémité 3' à n'importe quel exon ayant deux bases libres en 5' ; si le nouveau codon créé ne correspond pas à un codon stop, la phase ouverte de lecture sera conservée.

15

-Signaux :

Signal	Début	Fin
ATG	2001	2003
STOP	20979	20981
POLY Ad	21067	21073

Dans la colonne Signal sont décrits les éléments 20 caractéristiques de la molécule d'ARN messager : Initiation de la traduction (ATG), fin de la traduction (STOP) et signal de polyadénylation (POLY Ad). Les colonnes Début et Fin indiquent la position en nucléotide de début et de fin de ces signaux sur la 25 séquence génomique.

FIGURE 32 : Alignement des séquences humaine, murine et de rat, des ARNm codant pour la forme "complète" du LSR. Les séquences de LSR-Hs-2021 (indiqué lsr1.Hs dans la figure), de lisch7 de souris, N° ACCESSION : U49507

(indiqué lisch7.Mn) et de LSR-Rn-2097 (indiqué lsrl.Rn) ont étées alignées en utilisant Clustal W. Les nucléotides conservés dans les trois séquences sont repérés par un signe * placé sous les séquences. Des 5 tirets sont ajoutés à l'intérieur des séquences lorsque l'alignement optimal des séquences ne peut se faire sans créer ces microdélétions.

FIGURE 33 : Alignement des séquences des formes protéiques "complètes" du LSR, chez l'homme, la souris, 10 et le rat.

Sont alignées les séquences protéiques obtenues correspondant aux formes d'ARNm LSR-Hs-2021 codant pour une protéine de 643 acide aminés (répertorié lsrl.Hs), la séquence protéique de la forme longue de 593 acides 15 aminés de rat (répertoriée lsrl.Rn) et la séquence protéique de lisch7 de souris (N° ACCESSION : U49507, répertoriée lisch7.Mn). Les symboles (*) placés sous les alignements indiquent les acides aminés conservés, les symboles (.) indiquent les substitutions conservatives 20 d'acides aminés. Encadré, de l'extrémité NH₂-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, le site de liaison à la clathrine [NPGY], le consensus d'adressage lysosomal : di-leucine LI-X10-LL, le site putatif d'interaction avec gC1q-R [RSRS]. Surligné, la signature du récepteur du 25 TNF avec (flèche) ; indiqués, les acides aminés conservés dans la signature. Le domaine transmembranaire est situé entre le dernier di-leucine et la signature du TNF.

FIGURE 34 : Alignement des trois formes de LSR mises en évidence chez le rat, et des deux formes mises en évidence chez l'homme.

Les séquences protéiques des différentes formes de LSR de rat et humain ont été alignées. Lsrl-Rn représente la

forme longue de 593 acides aminés de LSR de rat, lsr2-Rn représente la forme de 574 acides aminés décrite chez le rat, lsr3-Rn représente la forme courte de 525 acides aminés de rat. Lsrl1-Hs et lsr2-Hs correspondent respectivement aux formes d'ARN LSR-Hs-2021 et LSR-Hs-1817 codant respectivement pour une protéine de 643 et 575 acide aminés. Les symboles (*) placés sous les alignements indiquent les acides aminés conservés, les symboles (.) indiquent les substitutions conservatives d'acides aminés. Encadré, de l'extrémité NH₂-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, le site de liaison à la clathrine [NPGY], le consensus d'adressage lysosomal : di-leucine LI-X10-LL, le site putatif d'interaction avec gC1q-R [RSRS]. Surligné, la signature du récepteur du TNF avec (flèche) ; indiqués, les acides aminés conservés dans la signature.

FIGURE 35 : Représentation schématique des deux formes de LSR mises en évidence chez l'homme, indiquant les motifs conservés sur chacune d'elle.

A) Représentation schématique de l'organisation génomique du LSR humain à partir du premier exon codant. Les exons sont indiqués par des boîtes, les introns par des barres interrompues. La taille en nucléotides des exons et des introns est indiquée au dessus de ceux-ci. Les éléments caractérisant le messager et la protéine codée sont reportés sur cette figure. La cartouche sur la droite donne la signification des symboles utilisés.

B) Structure de la forme LSR-Hs-2021 de LSR humain.

Cette forme encode une protéine de 636 acide aminés (aa).

C) Structure de la forme épissée de LSR humain, LSR-Hs-1817. Cette forme encode une protéine de 575 acides aminés (aa).

FIGURE 36 : Effet des oléates sur la fixation et 5 l'internalisation des ^{125}I -LDL dans des fibroblastes humains normaux, en conditions normales.

Les cellules sont préalablement cultivées durant une semaine comme décrit précédemment, à l'exception que le milieu contient 20% de sérum bovin foetal (Goldstein et 10 al ., 1983). Ensuite, elles sont incubées avec des concentrations croissantes de ^{125}I -LDL en absence (o) ou en présence (v) de 1mM oléate. Les cellules sont ensuite lavées, lysées, et comptées pour leur radio-activité.

FIGURE 37 : Effet de concentrations croissantes de 15 leptine sur l'activité LSR de fibroblastes humains FH (hypercholestérolémie familiale).

Les fibroblastes FH sont incubés 30 minutes à 37°C avec des concentrations croissantes de leptine, puis 2 heures à 37°C avec 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ^{125}I -LDL, en présence de 500 μM 20 d'oléate. La fixation, l'internalisation et la dégradation des LDL sont mesurées comme précédemment.

Figure 38 : Séquence génomique du gène LSR humain.

La séquence génomique du LSR humain comprend 2000 paires de bases en amont d'un des sites possibles d'initiation 25 de la traduction et 1007 paires de base en aval du site de polyadénylation. Les exons ont été déterminés en alignant les séquences de LSR-Rn-2097 et de lisch7 de souris avec la séquence génomique humaine. La conservation de la phase ouverte de lecture a été 30 recherchée. La comparaison entre la séquence déduite et celle des ARNm humains obtenus biologiquement a permis de préciser les sites d'épissage entre les exons 1 et 2,

de confirmer les autres sites d'épissage et d'allonger le premier exon en 5' de 97 pb.

- Description des exons.

5

EXON	DEBUT	FIN	5' EPIS.	BL 5'	3' EPIS.	BL 3'
Ex1	>1904	2253	None	---	GTACGG	+ 2
Ex2	3437	3781	CAG	+ 1	GTATGT	+ 1
Ex3	12067	12186	CAG	+ 2	GTGAGT	+ 1
Ex4	15047	15103	CAG	+ 2	GTACGG	+ 1
Ex5	15668	15814	CAG	+ 2	GTAAGT	+ 1
Ex6	19481	19654	CAG	+ 2	GTGAGG	+ 1
Ex7	19801	19860	CAG	+ 2	GTGAGA	+ 1
Ex8	19958	20089	TAG	+ 2	GTAAGC	+ 1
Ex9	20231	20856	CAG	+ 2	GTGAGG	0
Ex10	20946	<20978	CAG	0	-----	

La colonne EXON indique les exons numérotés de 1 à 10 dans l'ordre 5'-3' de leur détermination sur la séquence génomique. Les colonnes DEBUT et FIN indiquent la position du premier et du dernier nucléotide de l'exon considéré. Dans les colonnes 5'EPIS. et 3'EPIS. sont indiquées les séquences du site d'épissage bordant l'exon en 5' et 3'. Les colonnes BL 5' et BL 3' indiquent le nombre de bases respectivement en 5' et en 3' d'un exon qui ne seront engagées dans la phase de lecture du messager qu'après l'épissage. Par exemple : l'exon 7 ayant une base libre en 3', cet exon peut être joint à l'extrémité 5' de l'exon 8 qui a 2 bases libres en 5'. L'ensemble 1 base + 2 bases reconstitue le codon qui était détruit par l'intron dans la séquence génomique.

Signaux :

Signal	Début	Fin
ATG préféré	2145	2147
Autre ATG possible	2001	2003
STOP	20979	20981
POLY Ad	21067	21073

Dans la colonne Signal sont décrits les éléments caractéristiques de la molécule d'ARN messager : Initiation de la traduction (ATG), fin de la traduction (STOP) et signal de polyadénylation (POLY Ad). Les colonnes Début et Fin indiquent la position en nucléotide de début et de fin de ces signaux sur la séquence génomique. Un signal ATG d'initiation de la traduction est préféré à l'autre car celui-ci présente un environnement plus propice à l'initiation.

Figure 39 : Séquence nucléique de l'ADNc humain LSR-Hs-2062.

Figure 40 : Séquence peptidique de la protéine LSR humaine de 649 acides aminés.

Figure 41 : Séquence nucléique de l'ADNc humain LSR-Hs-2005.

5 **Figure 42** : Séquence peptidique de la protéine LSR humaine de 630 acides aminés.

Figure 43 : Séquence nucléique de l'ADNc humain LSR-Hs-1858.

10 **Figure 44** : Séquence peptidique de la protéine LSR humaine de 581 acides aminés.

Figure 45 : Représentation schématique des trois formes de LSR mises en évidence chez l'homme, indiquant les motifs conservés sur chacune d'elle.

15 A- Représentation schématique de l'organisation génomique du LSR humain à partir du premier exon codant. Les exons sont indiqués par des boîtes, les introns par des barres interrompues. La taille en nucléotides des exons et des introns est indiquée au dessus de ceux-ci. Les éléments caractérisant le messager et la protéine codée sont reportés sur cette figure. La cartouche sur 20 la droite donne la signification des symboles utilisés.

B- Structure de la forme LSR-Hs-2062 de LSR humain. Cette forme encode une protéine de 649 acides aminés.

25 C- Structure de la forme LSR-Hs-2005 de LSR humain. Cette forme encode une protéine de 630 acides aminés.

D- Structure de la forme LSR-Hs-1858 de LSR humain. Cette forme encode une protéine de 581 acides 30 aminés.

Figure 46 : Séquence nucléique de l'ADNc de souris LSR-

Mm-1886.

Figure 47 : Séquence nucléique de l'ADNc de souris LSR-Mm -1829.

Figure 48 : Séquence nucléique de l'ADNc de souris LSR-Mm -1682.

5 **Figure 49** : Séquence peptidique de la protéine LSR de souris de 594 acides aminés.

Figure 50 : Séquence peptidique de la protéine LSR de souris de 575 acides aminés.

10 **Figure 51** : Séquence peptidique de la protéine LSR de souris de 527 acides aminés.

15 **Figure 52** : Alignement des séquences protéiques des formes longues du LSR humain, de rat et de souris, les séquences des formes du LSR humain, étant celles obtenues après allongement de l'exon 1 en 5' et précision des sites d'épissage entre les exons 1 et 2, les séquences des formes du LSR souris étant celles obtenues après clonage de l'ADNc du LSR de souris et analyse des produits de l'épissage alternatif. Les symboles (*) placés sous les alignements indiquent les 20 acides aminés conservés, les symboles (.) indiquent les substitutions conservatives d'acides aminés. Encadré, de l'extrémité NH₂-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, le site de liaison à la clathrine [NPGY], le consensus d'adressage lysosomal : di-leucine LI-X10-LL, 25 le site putatif d'interaction avec gC1q-R [RSRS]. Surligné, la signature du récepteur du TNF avec (flèche) ; indiqués, les acides aminés conservés dans la signature. Le domaine transmembranaire est situé entre le dernier di-leucine et la signature du TNF.

Figure 53 : Alignement des séquences nucléotidiques des formes longues du LSR humain, de rat et de souris, les séquences des formes du LSR humain, étant celles obtenues après allongement de l'exon 1 en 5' et 5 précision des sites d'épissage entre les exons 1 et 2, les séquences des formes du LSR souris étant celles

obtenues après clonage de l'ADNc du LSR de souris et analyse des produits de l'épissage alternatif. Les nucléotides conservés dans les trois séquences sont repérés par un signe * placé sous les séquences. Des 5 tirets sont ajoutés à l'intérieur des séquences lorsque l'alignement optimal des séquences ne peut se faire sans créer ces microdélétions.

Figure 54 : Alignement des séquences protéiques des trois formes du LSR humain les séquences des formes du 10 LSR humain, étant celles obtenues après allongement de l'exon 1 en 5' et précision des sites d'épissage entre les exons 1 et 2. Les symboles (*) placés sous les alignements indiquent les acides aminés conservés, les symboles (.) indiquent les substitutions conservatives 15 d'acides aminés. Encadré, de l'extrémité NH₂-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, le site de liaison à la clathrine [NPGY], le consensus d'adressage lysosomal : di-leucine LI-X10-LL, le site putatif d'interaction avec gC1q-R [RSRS]. Surligné, la signature du récepteur du 20 TNF avec (flèche) ; indiqués, les acides aminés conservés dans la signature. Le domaine transmembranaire est situé entre le dernier di-leucine et la signature du TNF.

Figure 55 : Alignement des séquences nucléotidiques des 25 trois formes du LSR humain, les séquences des formes du LSR humain, étant celles obtenues après allongement de l'exon 1 en 5' et précision des sites d'épissage entre les exons 1 et 2. Les nucléotides conservés dans les trois séquences sont repérés par un signe * placé sous 30 les séquences. Des tirets sont ajoutés à l'intérieur des séquences lorsque l'alignement optimal des séquences ne peut se faire sans créer ces microdélétions.

Figure 56 : Alignement des séquences protéiques des trois formes du LSR de rat. Les symboles (*) placés sous les alignements indiquent les acides aminés conservés, les symboles (.) indiquent les substitutions

conservatives d'acides aminés. Encadré, de l'extrémité NH₂-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, le site de liaison à la clathrine [NPGY], le consensus d'adressage lysosomal : di-leucine LI-X10-LL, le site 5 putatif d'interaction avec gC1q-R [RSRS]. Surligné, la signature du récepteur du TNF avec (flèche) ; indiqués, les acides aminés conservés dans la signature. Le domaine transmembranaire est situé entre le dernier di-leucine et la signature du TNF.

10 **Figure 57** : Alignement des séquences nucléotidiques des trois formes du LSR de rat. Les nucléotides conservés dans les trois séquences sont repérés par un signe * placé sous les séquences. Des tirets sont ajoutés à l'intérieur des séquences lorsque l'alignement optimal 15 des séquences ne peut se faire sans créer ces microdélétions.

16 **Figure 58** : Alignement des séquences protéiques des trois formes du LSR de souris, les séquences des formes du LSR souris étant celles obtenues après clonage de l'ADNc du LSR de souris et analyse des produits de l'épissage alternatif. Les symboles (*) placés sous les alignements indiquent les acides aminés conservés, les symboles (.) indiquent les substitutions conservatives 20 d'acides aminés. Encadré, de l'extrémité NH₂-terminale vers l'extrémité COOH-terminale, le site de liaison à la clathrine [NPGY], le consensus d'adressage lysosomal : 25 di-leucine LI-X10-LL, le site putatif d'interaction avec gC1q-R [RSRS]. Surligné, la signature du récepteur du TNF avec (flèche) ; indiqués, les acides aminés 30 conservés dans la signature. Le domaine transmembranaire est situé entre le dernier di-leucine et la signature du TNF.

Figure 59 : Alignement des séquences nucléotidiques des trois formes du LSR de souris, les séquences des formes du LSR souris étant celles obtenues après clonage de

l'ADNc du LSR de souris et analyse des produits de l'épissage alternatif. Les nucléotides conservés dans les trois séquences sont repérés par un signe * placé sous les séquences. Des tirets sont ajoutés à 5 l'intérieur des séquences lorsque l'alignement optimal des séquences ne peut se faire sans créer ces microdélétions.

Procédures expérimentales

10

Matériel

Na¹²⁵I est fourni par Amersham (Les Ulis, France). L'acide oléique, l'albumine bovine sérique (A 2153) (BSA) et le Triton X-100 proviennent de chez Sigma (St 15 Quentin Fallavier, France). La lactoferrine humaine (Serva) et l'héparine sodique sont fournies par Biowhittaker (Fontenay sous Bois, France) et les laboratoires Choay (Gentilly, France) respectivement. Les kits enzymatiques pour la détermination des 20 triglycérides (TG) proviennent de chez Boehringer Mannheim (Meylan, France). Le suramine sodium est obtenu de CBC Chemicals (Woodburg, CT). Le milieu Dulbecco, Eagle modifié (DMEM), la trypsine et le sérum de veau foetal sont fournis par Life Technologies, Inc. (Eragny, 25 France).

Animaux

Les souris C57BL/6J type sauvage, C57BL/6J ob/ob, C57BL/Ks type sauvage et C57BL/Ks db/db sont obtenues de 30 R. Janvier Breeding Center (Le Genest St Isle, France).

Cellules

Les fibroblastes normaux (GM08333) et FH (GM00486A, GM007001B, GM00488C) sont fournis par le NIGMS human genetic mutant cell repository (Camden, NJ). Les cellules sont étalées dans des boîtes de Petri de 36 mm

comme décrit précédemment (300.000 fibroblastes normaux par puits, 150.000 fibroblastes FH par puits), et sont cultivées dans une étuve à CO₂ humidifiée, en milieu DMEM contenant 10% (fibroblaste normaux) ou 20% 5 (fibroblastes FH) de serum de veau foetal, 2mM glutamine, 100 u/ml de pénicilline et 100 u/ml de streptomycine.

Les hépatocytes en culture primaire sont obtenus suivant le protocole décrit précédemment (Mann et al., 10 1995). Les cellules sont ensuite étalées à 900.000 cellules par puits ou 22x10⁶ cellules par fiole de 165 cm². Les cellules sont utilisées pour les études après 48 heures en culture.

15 Préparation et radiomarquage des lipoprotéines

Les VLDL ($d < 1,006$ g/ml) et LDL ($1,025 < d < 1,055$ g/ml) sont isolées par ultracentrifugation séquentielle de plasma frais de volontaires (Bihain et Yen, 1992 ; Goldstein, et al., 1983) et utilisées avant 2 semaines. 20 Les lipoprotéines sont radioiodinées (Bilheimer et al., 1972) et utilisées moins d'une semaine après le marquage. ¹²⁵I-LDL et ¹²⁵I-VLDL sont filtrés (membrane 0,22 µm, Gelman) immédiatement avant utilisation.

25 Mesure de la fixation des lipoprotéines sur membranes plasmiques

L'activité du LSR est mesurée sur une préparation de membranes plasmiques de foie de rat (Bartles et Hubbard, 30 1990). Ces membranes présentent un enrichissement en 5-nucléotidase (marqueur spécifique des membranes plasmiques) de 10 à 15 fois. Des aliquots de 100µg de protéines sont incubés pendant 30 minutes à 37°C en

présence ou en absence de 0,8 mM d'oléate dans un volume final de 250 μ l complété par du PBS 100 mM, EDTA 2 mM, NaCl 350 mM, pH 8 (tampon A). L'oléate est ajouté dans un volume de 5 à 10 μ l d'isopropanol. L'oléate en excès et non fixé, est ensuite éliminé par 6 lavages. Les culots sont resuspendus par 250 μ l de tampon d'incubation, soniqués 5 secondes, puissance 1,90% du cycle actif, puis centrifugés 15 min à 18 000 rpm. Les membranes activées sont incubées pendant 1 heure à 4 °C avec les différentes concentrations d'anticorps puis ensuite avec 5 μ g/ml de 125 I-LDL (1 heure à 4°C). 25 μ l de BSA 2% sont ajoutés au mélange d'incubation. La quantité de 125 I-LDL liées aux membranes est mesurée en sédimentant les membranes par centrifugation après avoir déposé 200 μ l du mélange d'incubation sur une couche de 5% (P/V) de BSA dans le tampon A. Les surnageants sont éliminés par aspiration, les fonds des tubes sont coupés et la radioactivité est comptée dans un compteur γ .

20 Mesure du nombre apparent de récepteurs LSR sur membranes plasmiques

Le nombre apparent de récepteurs LSR sur membranes plasmiques est mesuré comme décrit précédemment (Mann et al., 1995). Les membranes plasmiques (100 μ g) sont incubées avec 1mM oléate ; elles sont ensuite lavées trois fois comme indiqué ci-dessus, puis incubées 1 heure à 37°C avec 40 μ g/ml d' 125 I-LDL. La quantité d' 125 I-LDL fixés aux membranes plasmique est ensuite déterminée par comptage.

30 Mesure de la fixation, de l'internalisation et de la dégradation des lipoprotéines par les hépatocytes (ou fibroblastes)

L'activité LSR dans les cultures primaires d'hépatocytes de rat ou les fibroblastes humains est mesurée par la fixation, l'internalisation et la dégradation de ^{125}I -LDL et de ^{125}I -VLDL (LDL : lipoprotéine de faible densité ; VLDL : lipoprotéine de très faible densité), comme décrit dans Bihain et Yen, 1992 et Mann, et al., 1995.

10 *Mesure de l'effet inhibiteur d'anticorps anti-LSR sur la fixation, l'internalisation et la dégradation des LDL par le LSR dans des hépatocytes en culture primaire :*

15 Des cultures primaires d'hépatocytes de rat (48 h après étalement) sont incubées en présence de 20 ng de leptine/puits pendant 30 min à 37° C, suivi par l'addition d'anticorps anti-LSR en présence ou en absence d'oléate. Après incubation à température ambiante pendant 30 min, on ajoute de l' ^{125}I -LDL (20 $\mu\text{g/ml}$), puis les cellules sont incubées pendant 4 h à 37° C. La fixation, l'incorporation et la dégradation de 20 l' ^{125}I -LDL sont mesurées comme décrit précédemment.

Purification partielle du LSR

25 La technique consiste à isoler par centrifugation différentielle (Belcher et al., 1987) les membranes de foie de rat, et à solubiliser les protéines membranaires dans une solution contenant 125 mM d'octylglucoside, 20mM Tris et 2mM EDTA pH8. Les protéines ainsi solubilisées sont séparées dans des conditions non dénaturantes sur un gel (épaisseur 5mm) SDS préparatif 30 formé d'un gradient de 4 à 12 % de polyacrylamide (35-50 mg par gel). Pour une partie du gel, les protéines sont ensuite électrotransférées (transfert semi-sec, 21V, 45

min, Biorad) sur une membrane de nitrocellulose. Après blocage des sites libres de cette membrane dans une solution de PBS contenant 3 % d'albumine, la membrane est incubée avec 40 μ g/ml de 125 I-LDL en présence (Figure 5 11, ligne 2) ou absence (Figure 11, ligne 1) d'oléate à 0,8 mM. La membrane est ensuite lavée cinq fois 10 minutes dans du PBS contenant 0,5 % (v/v) de Triton x100, et exposée sur un écran de Phosphor Imager . Les protéines d'intérêt sont électroéluées (Eletroeluter, 10 Biorad). Le LSR ainsi purifié est ensuite utilisé pour la préparation des anticorps.

Préparation d'anticorps polyclonaux

La préparation d'antigène est injectée à un lapin en sous-cutané en présence d'adjuvant de Freund complet suivi d'un protocole classique d'immunisation . Le titre 5 d'anticorps dirigé contre les protéines de rat est déterminé régulièrement (technique par dot blot). Lorsque celui-ci est jugé suffisant, la spécificité des anticorps obtenus est testée par Western blotting.

La protéine LSR utilisée comme antigène pour la 10 production des anti-LSR a été préparée comme indiqué en exemple 1.

Les séquences des peptides synthétiques utilisés comme antigènes pour lever des anticorps contre une région spécifique du LSR (anticorps anti-peptide LSR) ou contre 15 deux régions de la protéine gC1q-R (anticorps dirigés contre un peptide issu de la région NH₂ terminale de la protéine, et anticorps dirigé contre sa région COOH terminale), sont les suivantes :

-peptide LSR : SAQDLDGNNEAYAELIVLGR
20 (acides aminés 169 à 188 de LSR)
-peptide NH₂-terminal de gC1q-R : LRCVPRVLGSSVAGY*
(acides aminés 5 à 19 de gC1q-R)
-peptide COOH-terminal de gC1q-R : C*YITFLEDLKSFVKSQ
(acides aminés 268 à 282 de gC1q-R).
25 *: acides aminés différant de la séquence protéique, afin d'optimiser l'antigénicité des peptides.

Immunoprécipitation d'extraits d'hépatocytes en présence d'anticorps spécifiques

30 Des cultures primaires d'hépatocyte de rat (Oukka et al., 1997) sont incubées pendant 60 minutes à 2 heures en présence d'un mélange de S35 méthionine et cystéine (Promix, Amersham). Ce milieu est ensuite enlevé et les

cellules sont lavées, puis incubées dans du PBS contenant 1% de Triton X100. Ce lysat cellulaire est ensuite incubé en présence d'anticorps non-spécifiques puis de protéine A. L'équivalent de 40 µg d'anticorps spécifiques anti-LSR est ensuite ajouté et les complexes LSR-anticorps sont précipités à l'aide d'une seconde préparation de protéine A. Après lavage, les complexes sont dissociés en présence de 1% SDS supplémenté ou non par 5% de β -mercaptoéthanol, incubés à 100°C pendant 5-10 minutes, et séparés sur un gel de 10% acrylamide. Les 10 gels sont séchés et exposés sur un écran de Phosphor Imager. Chacune des lignes contient l'équivalent d'un flacon de 165 cm² soit 22 X 106 cellules.

Criblage d'une librairie d'expression

15 Après infection des bactéries par des bactériophages lambda GT11 contenant de l'ADNc de foie de rat (obtenu commercialement de Clontech Laboratories Inc (5' Strehc plus c-DNA Library), les cellules sont étalées sur milieu LB MgSO₄. Après 4 heures de cultures à 42°C, une 20 membrane de nitrocellulose préalablement incubée dans une solution d'IPTG 10mM, est déposée dans les boites de pétri. Quatre heures plus tard, la première membrane est retirée et une seconde est appliquée sur la boite de pétri.

25 Chaque membrane est immergée dans une boite de pétri contenant du tampon bloquant sous agitation pendant une heure. Ensuite, l'anticorps est ajouté à une concentration finale de 10 microgrammes/ml de tampon bloquant (Huynh et al., 1984 ; Young et Davis, 1983a et 30 1983b). Les membranes sont ensuite lavées trois fois 10 minutes avec du TNT (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 à 0,05 %).

Les membranes sont incubées en présence de l'anticorps secondaire (alkaline phosphatase-conjugated affinipure F(ab') 2 Fragment Goat anti-rabbit IgG ; Immunotech) à une concentration finale de 0,08 5 microgramme/ml de tampon bloquant (TNT + 5% lait écrémé en poudre, marque Pâturage).

Après lavage des membranes dans le TNT, celles-ci sont incubées en présence de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) et de NBT (nitro-blue-tetrazolium) jusqu'à obtention d'une coloration.

5 Les clones positifs sont ensuite récupérés sur les boites, titrés et soumis à la même procédure d'immunocriblage afin de confirmer qu'il s'agit de vrai positifs (criblage secondaire). Eventuellement, un criblage tertiaire peut être conduit. L'ADN phagique des 10 clones retenus, isolé à partir d'un lysat bactérien (protocole Clontech), et digéré par l'enzyme de restriction EcoR1 est inséré au site EcoRI du plasmide pBluescript SK+.

15 Northern blotting

Les membranes contenant les ARNm de différents tissus de rat (Clontech) ont été hybridées avec des fragments de l'ADNc du gène LSR de l'ADNc de β -actine humaine (Clontech), marqués au dCTP[33P], en tampon 5xSSPE, 20 10xDenhardt, 0,5% SDS, 100 μ g/ml d'ADN de sperme de saumon, 50% formamide déionisée, à 42°C pendant 16 heures. Les membranes ont été ensuite lavées dans du 2xSSC, 0,5% SDS à température ambiante et dans du 1xSSC, 0.1% SDS à 65°C, puis exposées au Phospor Imager 25 (Molecular Dynamics).

Traduction in vitro

Les ADNc sont sous-clonés dans le plasmide pcDNA3; transcription et traduction in vitro sont conduites en 30 utilisant le kit TNT de Promega. Les produits sont visualisés après électrophorèse en gel gradient de polyacrylamide (10%) et exposition au Phospor Imager.

Flotation

Les produits de traduction in vitro (17 μ l) marqués à la 35 S-méthionine sont incubés 1 heure à 37°C en présence de 100 μ g/ml de LDL, 1mM oléate en tampon A,

dans un volume final de $400\mu\text{l}$. Un volume égal de BSA 8% (p /v) est ajouté. La densité est ajustée à 1,21 g/ml (assumant une densité d'origine de 1,025 g/ml), avec du sodium bromide. Les échantillons sont alors déposés sur 5 une solution de sodium bromide à 1,063 g/ml, puis centrifugés 20 heures à 4°C (rotor Beckman SW41). Un volume de 1 ml est recueilli en surface, dialysé contre du tampon d'élution d'électrophorèse, et la radioactivité est comptée (compteur β Beckman).

10

Préparation et radiomarquage de la leptine recombinante de souris

L'ADNc de leptine est obtenu à partir de l'ARNm de tissu adipeux de souris C57BL/6J par PCR. L'amorce 5' de PCR 15 introduit un codon d'initiation après la séquence signale qui est déletée et une séquence codant pour une terminaison hexahistidine. La séquence modifiée codant pour la leptine murine est clonée dans un vecteur d'expression pSE280 (Invitrogen, France) et exprimée 20 dans E.Coli. Le séquençage de l'ADN du plasmide confirme la séquence codante. Les bactéries sont cultivées à 37° C et la synthèse de la protéine est induite par 1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside. Les bactéries, récupérées après centrifugation douce, sont lysées par 25 congélation-décongélation et l'ADN est digéré par une déoxyribonucléase I. Les membranes cellulaires sont extraites à l'aide de détergent et les corps d'inclusions sont séparés après centrifugation. Après 3 lavages dans 1% de deoxycholate de sodium en PBS, les 30 corps d'inclusion sont solubilisés dans une solution de guanidine-HCl 6M. La renaturation de la protéine recombinante est réalisée par dilution au 1/100 dans du

PBS. La protéine renaturée est ensuite purifiée et concentrée sur colonne de chromatographie d'affinité métal chélate au Nickel (Probond, Invitrogen). L'élution est effectuée par de l'imidazol. On contrôle la pureté 5 de la leptine recombinante par électrophorèse SDS-PAGE et son activité par l'évaluation de la satiété chez des souris C57BL/6J ob/ob après injection intrapéritonale de 25 µg de leptine. La leptine recombinante est ensuite radiomarquée en utilisant des Iodo-Beads (Pierce) et 10 selon la méthode préconisée par le fabricant.

Mesure de la réponse lipidique post-prandiale chez les souris

Des souris contrôles, ob/ob et db/db à jeun depuis la 15 veille sont gavées avec un repas très riche en graisse [60% de graisse (acides gras saturés 37%, monoinsaturés 27% et polyinsaturés 36%), 20% de protéines et 20% d'hydrate de carbone] fournissant 56 kcal d'énergie / kg du poids de l'animal. À différents temps, on prélève 20 dans des tubes contenant 90µg d'EDTA disodique, 20 µl de sang par la veine caudale, et après séparation du plasma par centrifugation, on détermine la concentration plasmatique en triglycéridémie à l'aide d'un kit de dosage enzymatique.

25

Mesure de la clairance de la leptine chez les souris

Les souris (6-8 semaines) femelles à jeun reçoivent 30 par la veine caudale une injection de 80 ng de ^{125}I -leptine recombinante murine ou de ^{125}I - β_2 -microglobuline (Sigma, marquée par la méthode Iodobeads, comme la leptine). Cinq minutes après, les animaux sont perfusés avec une solution saline physiologique (15 ml). Les

tissus sont prélevés, et comptés pour leur radioactivité (compteur Gamma). Dans certains cas, un anti-corps anti-LSR ou une protéine contrôle sont injectés 30 minutes avant l'injection de ^{125}I -leptine.

5 Il est important de noter que le marquage de la leptine avec l' ^{125}I n'a pas d'effet sur son activité biologique.

Chromatographie d'affinité leptine

On utilise une colonne Hi-trap (Pharmacia) : 5mg de leptine sont fixés sur 1ml de colonne, selon les méthodes préconisées par le fabricant. Les protéines de membrane plasmique sont solubilisées à partir de foies de rat comme indiqué précédemment (Mann et al., 1995), puis dialysées une nuit contre du PBS pH 7,4, 0,1% Tween 20. La colonne est lavée dans le même tampon, et l'extrait protéique est déposé à un débit de 0,2 ml/minute. La colonne est lavée par 6 ml du même tampon. Elle est ensuite éluée par le même tampon supplémenté de 100mM glycine pH 3 ; 20 fractions de 500 μ l sont alors neutralisées par 5 μ l de PBS, 0,1% Tween 20 pH 8. 50 μ l de chaque fraction sont déposés sur membrane de nitrocellulose pour analyse en Dot blot au moyen de l'anticorps anti-LSR. Les fractions positives (1, 3, 4, 7 et 8) sont dialysées contre du bicarbonate d'ammonium 24 mM, Tween 20 0,01%, poolées et concentrées au speed vac en un volume final de 300 μ l. 40 μ l du produit final sont analysés en Western blot au moyen d'anticorps anti-LSR.

Purification de la sous-unité γ du LSR

Des anticorps anti-LSR (bande A) sont couplés à une résine [2,5 mg d'IgG pour 3,5 ml de résine affi-gel Hz immunoaffinity kit (Biorad 153-6060)] qui est ensuite incubée avec des protéines solubilisées à partir de membranes totales de foie de rat (tampon Tris 20 mM, EDTA 2mM, Octylglucoside 0,125 M (5 X CMC), inhibiteur cocktail 1%, PH 7.4 : 160 mg de protéines membranaires donnent 41,3 mg de protéines solubilisées (PS) dans un volume de 17 ml.

- L'incubation est réalisée pendant 12 heures : 17 ml complétés à 50 ml avec du tampon Tris 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4 avec les 3,5 ml de résine, sous agitation rotative, à température ambiante. La résine est lavée 5 avec 40 ml de tampon Tris 20 mM, EDTA 2mM, pH 7,4 puis

éluée avec du tampon Tris 20 mM, EDTA 2 mM, glycine 200 mM, pH 2,5 en 30 fractions de 500 µl. Le pH de chaque fraction est neutralisé avec 100 µl par tube de tampon Tris 1M, EDTA 2mM, pH 9. 50 µl de chaque fraction 5 sont déposés sur une membrane de nitrocellulose pour analyse en dot blot : incubation avec l'anticorps anti-LSR, puis avec un second anticorps couplé à la phosphatase alcaline.

- Les fractions positives de 7 à 28 sont poolées 2 par 2 10 et concentrées 2,5 fois au Speedvac. Un Western blot sur les fractions poolées concentrées et séparées, sur un gel PAGE-SDS 10% est réalisé. Des bandes sont observées dans les fractions 7 à 14 (les fractions sont poolées).

- Les deux pools sont dialysés contre du bicarbonate 15 d'ammonium 24 mM, puis lyophilisés au Speedvac. La poudre est reprise dans 80 µl de tampon Tris 20 mM, EDTA 2 mM, SDS 2 %, Urée 3%, pH 7,4 réduite en présence de 5% β-mercaptopropanoïde 30 minutes à 100°C.

- Après migration et transfert humide en Tris 50 mM, 20 Borate 50 mM sur une membrane de séquençage (PVDF) à 30 mA, la membrane est colorée à l'Amido black.

Transfection cellulaire

Un système d'expression utilisant le plasmide pcDNA3 25 ainsi qu'un système d'expression inductible par l'ecdysone avec le plasmide pIND (No et al., 1996) sont utilisés pour l'expression du gène LSR dans des cellules animales. Le cDNA du LSR est souscloné à l'intérieur des plasmides pcDNA3 et pIND (Invitrogen) au niveau du site 30 de restriction EcoRI. Les constructions une fois obtenue sont utilisées pour transfecter les cellules animales CHO (cellule d'ovaire de hamster). Pour le système inductible, les cellules sont transfectées en même temps

avec le plasmide pVgRXR (Invitrogen). Ce second plasmide permet l'expression d'un récepteur qui quand il est associé à l'ecdysome, va se fixer sur une séquence

promotrice présente dans le plasmide pIND et située en 5' du gène candidat .

La transfection cellulaire est réalisée à l'aide du "superfect transfection reagent" (Qiagen). Le réactif de 5 ce système de transfection assemble l'ADN en une structure compacte, optimisant l'entrée de l'ADN dans les cellules. Le complexe une fois formé est chargé négativement et peut se fixer sur des récepteurs cellulaires chargés positivement. De plus, une fois dans 10 la cellule, le réactif tamponne le lysosome après sa fusion avec l'endosome, ceci entraînant une inhibition des nuclease endosomales.

Les cellules sont incubées en présence du complexe pendant 2 heures puis sont lavées avec du PBS et mises 15 en culture dans du milieu frais contenant les antibiotiques Zéocine (système d'expression avec ou sans induction) et génétidine (système d'expression avec induction) pour sélectionner les cellules transfectées. Après quelques jours de culture, un sous clonage 20 cellulaire est effectué en plaque de 96 trous de façon à obtenir des clones isolés.

Exemple 1

25 Identification du complexe protéique responsable de l'activité LSR: purification partielle, et caractérisation au moyen d'anticorps polyclonaux

La technique des ligand blotting a été utilisée pour 30 identifier le complexe protéique responsable de l'activité LSR. Cette technique, décrite en détail par Mann et al., 1995, est exposée en Matériels et Méthodes.

L'analyse de l'image obtenue en présence (Figure 11, ligne 2) ou absence (Figure 11, ligne 1) d'oléate à 0,8 mM met en évidence la présence de 3 bandes principales ayant fixé les LDL. Le PM apparent de la première bande 5 est d'environ 240 kDa, celui de la seconde est de 115 kDa et celui de la troisième est de 90 kDa. Sur la base de ces observations, deux hypothèses sont avancées : d'une part l'activité LSR est liée à la présence de plusieurs protéines distinctes ; d'autre part le même 10 type d'image peut s'expliquer par une organisation multimérique d'un complexe protéique.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons entrepris la purification de la bande présentant le poids moléculaire apparent le plus élevé (240 kDa). La 15 purification partielle de cette protéine désignée comme « bande A » est réalisée par électrophorèse préparative.

Les protéines de membrane plasmique de foie de rat ont été préparées et séparées sur gel de polyacrylamide comme ci-dessus. La localisation précise de la bande A a 20 été établie par ligand blotting réalisé après électrotransfert d'échantillon de gel préparatif prélevé à différents niveaux.

Les fragments de gel contenant la bande A sont ensuite prélevés et électroélus. Les protéines ainsi 25 éluées sont ensuite concentrées (speedvac) et testées pour leur capacité à fixer les LDL en présence d'oléate après électrophorèse et transfert sur membranes de nitrocellulose (ligne 3). Les protéines ainsi obtenues ont été utilisée pour lever des anticorps polyclonaux 30 (voir Matériels et Méthodes), dont la spécificité a été testée par Western blotting. Les résultats de la Figure 11 ligne 4 indiquent que les anticorps produits à partir des protéines de la bande A se fixent sur 3 bandes

protéiques principales (240 kDa, 115 kDa et 90 kDa) qui fixent les ^{125}I -LDL en présence d'oléate (Figure 11, ligne 4). Afin de vérifier le lien entre ces complexes protéiques et l'activité LSR, nous avons testé l'effet 5 de ces anticorps polyclonaux sur l'activité LSR. Les méthodes mises en jeux ont été décrites en détails précédemment (Mann et al., 1995 ; Troussard et al., 1995). L'activité du LSR est mesurée selon le protocole exposé en Matériels et méthodes.

10 L'effet inhibiteur d'anticorps anti-LSR, sur l'activité LSR, comparé à celui d'une préparation quelconque d'immunoglobulines de lapin est montré dans la Figure 12A. On confirme ainsi que le complexe multimérique décrit ci-dessus est responsable de l'activité du 15 récepteur, et on valide la technique de ligand blotting utilisée pour l'identifier. L'effet des anticorps anti-bande A a en outre été testé sur les autres étapes de l'activité du récepteur: l'internalisation et la dégradation des lipoprotéines par le LSR exprimé en 20 surface d'hépatocytes en culture primaires (selon le protocole décrit en Matériels et Méthodes). Les données de la Figure 12B montrent que les anticorps anti-bande A inhibent la plus grande partie de l'activité de fixation des LDL aux LSR présents au niveau des hépatocytes.

25 Cette inhibition induit une diminution dans les mêmes proportions de l'internalisation et de la dégradation protéolytique des lipoprotéines.

Les anticorps anti-bande A sont ainsi caractérisés comme anti-LSR. Leur spécificité relative a enfin été 30 définie par une méthode d'immunoprecipitation sélective. Des extraits d'hépatocytes en culture primaire sont immunoprecipités au moyen des anticorps anti-LSR décrits précédemment, selon le protocole décrit en Matériels et

Méthodes. L'analyse des résultats indique qu'en conditions non réduites (Figure 13, lignes 2 et 3), les anticorps révèlent 3 bandes protéiques principales: 2 de poids moléculaire apparent 240 kDa et 180 kDa, 1 de poids moléculaire apparent de 68 kDa. On note également la présence de 2 bandes d'intensité plus faible correspondant à un poids moléculaire de 115 kDa et 90 kDa. Cette approche expérimentale met donc en évidence essentiellement les mêmes éléments protéiques que ceux identifiés par la méthode de ligand blotting. On observe par ailleurs qu'en conditions réduites, les éléments de haut poids moléculaire se dissocient en 3 éléments de poids moléculaires apparents respectifs de 68 kDa, 56 kDa et 35 kDa.

Cette observation indique que le récepteur LSR est un multimère composé de 3 types de sous-unités désignées respectivement comme α (PM 68 kDa), β (PM 56 kDa) et γ (PM 35 kDa). L'intensité relative des sous-unités α et β est proche alors que celle de la sous-unité γ est d'environ 1/4 de celle des 2 autres. Le LSR représente donc un multimère composé d'au moins trois sous-unités distinctes ; l'identification des éléments α et β a été réalisée par criblage d'une librairie d'expression , tandis que celle de l'élément γ a été réalisée par séquençage N-terminal après purification.

Exemple 2

Clonage du c-DNA codant pour le LSR α et β

Le criblage d'une banque d'expression au moyen des anticorps anti-LSR décrits précédemment a été réalisé comme indiqué en Matériels et Méthodes.

Deux clones contenant un insert de 1.8 kb ont ainsi 5 été obtenus, et se sont révélés de séquences identiques.

L'hybridation d'ARNm de foie de rat avec une sonde réalisée à partir de cet insert a mis en évidence deux bandes de tailles respectives de 1,9 kb et 2,1 kb (Figure 14A). L'analyse par Northern blotting de la 10 distribution tissulaire des messagers correspondants a montré qu'ils sont exprimés préférentiellement dans le foie (Figure 14B).

Un ADNc correspondant à la bande de 1,9 kb a été reconstruit par 5'RACE PCR à partir du fragment de 1,8 kb, et séquencé. Afin d'élucider la présence de bandes multiples en Northern blotting, plusieurs couples 15 d'amorces définissant des fragments de cette séquence

ont été synthétisés, et utilisés comme amorces pour une amplification en PCR selon les conditions exposée en Figure 14C. Alors que chaque couple d'amorces met en évidence un fragment unique, le couple bc' permet 5 d'amplifier trois fragments de tailles différentes. L'analyse des séquences de ces fragments permet de reconstituer la séquence de trois ADNc complets de LSR, ayant pour tailles respectives 2097 pb, 2040 pb et 1893 pb, et tous trois correspondant à un même messager 10 précurseur par épissage alternatif.

Ces trois ARN contiennent un cadre ouvert de lecture débutant par un codon AUG à la position 219 entouré d'une séquence consensus Kozak (Kozak, 1987 et 1990). Les poids moléculaires prédicts des protéines encodées 15 par ces trois ARNs sont respectivement de 66 kDa, 64 kDa et 58 kDa. La faible différence de taille entre les éléments de 66 kDa et 64 kDa n'est pas discernable par une analyse en électrophorèse. Aucun site de glycosylation n'est présent sur les séquences. Les deux cDNAs complets codant pour les formes la plus longue (66 20 kDa) et la plus courte (58 kDa) de LSR ont été traduites in vitro, selon le protocole indiqué en Matériels et Méthodes. Les poids moléculaires des produits obtenus, soit 68 kDa et 56 kDa (Figure 15), correspondent de 25 façon proche à ceux des sous-unités α et β du LSR.

Pour définir si les produits de ces ARNm sont responsables de l'activité du récepteur, trois approches expérimentales différentes ont été utilisées. Premièrement, un peptide correspondant aux résidus 169-30 186 du LSR produit de l'ARNm de taille 2097 pb a été synthétisé. La séquence de ce peptide est commune aux trois protéines identifiées ci-dessus. Des anticorps dirigés contre ce peptide synthétique ont été obtenus.

La Figure 16A montre l'effet inhibiteur de ces anticorps anti-peptide LSR sur la fixation des LDL au LSR présent sur les membranes plasmiques de rat. Deuxièmement, une purification partielle des sous-unités α et β a été 5 obtenue par solubilisation sélective à l'aide de sarkosyl ; une étude en Western et ligand blotting a montré que les éléments α et β fixent les anticorps polyclonaux anti-LSR (Figure 16B, ligne 1), les anticorps anti-peptide LSR (Figure 16B, ligne 2) , et 10 les LDL après incubation avec oléates (Figure 16B, ligne 4). Troisièmement, LSR 66 et 58 ont été obtenus in vitro par traduction à partir des ARN LSR-Rn-2097 et LSR-Rn-1893 marqués à la Cystéine S35, puis incubés avec des LDL en présence ou absence d'oléates. Le complexe LDL- 15 protéine a ensuite été réisolé par ultracentrifugation. L'oléate augmente la fixation du LDL aux LSR 56 (respectivement LSR 68) par un facteur 2 (5 respectivement). On montre ainsi que LSR 56 et LSR 68 fixent les LDL uniquement après incubation avec 20 l'oléate. L'ensemble de ces résultats indique que les ARN messagers LSR-Rn-2097 et LSR-Rn-2040 codent pour deux protéines indistinguables par électrophorèse et dont le poids moléculaire apparent est 68 kDa ; ces protéines correspondent à la bande α du LSR identifiée 25 après immuno-précipitation en conditions réduites. LSR β est vraisemblablement le produit de traduction de l'ARN 1893. Les analyses de stoechiométrie après immunoprécipitation indiquent que le complexe multimérique de poids moléculaire apparent 240 kDa est 30 le résultat d'un assemblage d'une sous-unité α avec trois sous-unités β . L'analyse des différents domaines

des protéines correspondant aux LSR α et β est compatible avec une fonction de récepteur lipoprotéique.

Exemple 3Analyse des séquences des sous-unités α et β du LSR

5 L'analyse systématique des produits des 3 ARN messagers décrits ci-dessus est représentée schématiquement Figure 17. La protéine encodée par l'ARN de plus longue taille (LSR-Rn-2097) présente les caractéristiques suivantes.

10 Plusieurs sites de phosphorylation sont localisés au niveau de l'extrémité NH₂ terminale, suggérant que celle-ci est orientée vers la région intracellulaire. Par ailleurs, la protéine présente, du côté NH₂ terminal, une séquence d'acides aminés hydrophobe, 15 séparées en deux parties par 2 prolines contiguës, qui induisent une structure en épingle à cheveux dont les deux bras seraient constitués d'acides aminés hydrophobes. Il est raisonnable de supposer que cette région représente le site de fixation des acides gras du 20 LSR. La structure en doigt de gant ainsi réalisée peut accommoder une chaîne hydrocarbonée aliphatique.

25 Du côté NH₂ terminal encore, se trouve une séquence consensus de fixation à la clathrine, protéine qui tapisse la face interne des « coated pits » (Chen et al., 1990). Ces régions spécifiques de la membrane plasmique permettent l'endocytose rapide des protéines membranaires. Une telle séquence consensus est retrouvée au niveau de la LRP- α_2 -macroglobuline récepteur, de la CRAM et du LDL-récepteur (Herz et al., 30 1988 ; Lee et al., 1990 ; Goldstein et al., 1995). Une mutation à ce niveau a comme conséquence un retard

important d'internalisation des LDL, et induit une hypercholestérolémie familiale (Davis et al., 1986). Entre ce signal de fixation à la clathrine et la chaîne hydrophobe qui correspond au segment transmembranaire 5 unique, se trouvent 2 motifs LI et LL (Letourneur et

al., 1992). Ces deux motifs sont retrouvés au niveau des protéines suivantes : glut 4 transporteur de glucose (Verhey et al., 1994); la chaîne invariante et le complexe d'histocompatibilité de classe II (Zhong et al., 1997 ; Parra-Lopez et al., 1997). Ces signaux contrôlent l'endocytose et l'adressage intracellulaire des protéines dans le système membranaire périphérique. Le récepteur possède ensuite une séquence d'acides aminés hydrophobe qui constitue un domaine transmembranaire potentiel. La longueur de ce segment ne permet qu'un seul passage à travers la bicoche phospholipidique (Brendel et al., 1992). Du côté carboxy-terminal on trouve ensuite une région riche en cystéine qui présente une homologie avec les récepteurs des cytokines et plus particulièrement : les récepteurs aux TNF 1 et 2 (Tumor Necrosis Factor 1 et 2) ; le récepteur au NGF de faible affinité (Nerve Growth factor) ; le récepteur soluble au TNF du virus de fibrome de Shope ; CD40, CD27 et CD30, récepteurs pour les cytokines CD40L, CD27L et CD30L ; la protéine de cellule T 4-1BB, récepteur pour la cytokine putative 4-1BBL, l'antigène FAS (APO 1), récepteur pour la protéine FASL impliquée dans l'apoptose, l'antigène OX40 de cellule T, récepteur pour la cytokine OX40L, et la protéine A53 du virus de la vaccine (Cytokines and their receptors, 1996 ; Banner et al., 1993).

Outre ce segment cystéine riche, on trouve une région d'acides aminés chargés alternativement + et - (Brendel et al., 1992). Cette région fournit un site de fixation potentiel pour les ligands apoprotéiques Apo B et Apo E.

Cette région contient en outre un motif RSRS retrouvé au niveau de la lamine (Simos et al., 1994) et du SF2' (Krainer et al., 1991).

La forme LSR encodée par l'ARN LSR-Rn-2040 possède tous 5 les domaines décrits précédemment d'après la séquence de LSR encodée par l'ARN LSR-Rn-2097, à l'exception de l'élément LI/LL, dont le doublet Leucine se trouve éliminé par épissage alternatif. Bien que possédant des 10 séquences très proches, LSR-Rn-2097 et LSR-Rn-2040 pourraient donc différer quant à leur vitesse de recyclage et leur adressage. La forme LSR-Rn-1893 ne possède pas de domaine transmembranaire, ni de région riche en cystéines et homologue des récepteurs à 15 cytokines. Toutefois, il possède au niveau NH₂-terminal la région hydrophobe séparée par une répétition de prolines, la région riche en acides aminés chargés, et le motif RSRS. Ce constituant, est vraisemblablement positionné entièrement à l'extérieur de la cellule, où 20 il est fixé par l'intermédiaire de ponts disulfures, soit au produit de LSR-Rn-2040, soit à celui de LSR-Rn-2097.

Exemple 4

25 Implication du LSR dans la clairance des cytokines

L'analyse de la séquence de la sous-unité α du LSR met en évidence une région riche en cystéine, qui correspond à une signature de récepteur à cytokines. Le LSR se 30 distingue cependant des récepteurs à cytokines par la présence de signaux permettant l'endocytose rapide du complexe récepteur/ligand (motif clathrine).

Nous avons émis l'hypothèse que ce récepteur pourrait servir à l'épuration des cytokines, et notamment de la leptine.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons mesuré 5 la dégradation de la leptine recombinante par des hépatocytes en culture primaire (Matériels et Méthodes). Cette dégradation est inhibée par :

- a) les anticorps polyclonaux dirigés contre le LSR. Ces anticorps inhibent également dans les mêmes proportions 10 l'activité LSR
- b) la 39 kD Receptor Associated Protein (RAP) ; cette protéine bloque l'activité LSR in vitro et retarde la clairance des chylomicrons in vivo (Troussard et al. 1995 ; Willow et al., 1994)
- c) la chloroquine ; ce poison cellulaire empêche 15 l'acidification des vésicules d'endocytose et inhibe l'activité des protéases lysosomales
- d) l'oléate ; cet acide gras libre induit le changement de conformation du LSR, qui démasque le site de fixation 20 des lipoprotéines.

Ceci indique que la conformation FAF (Fatty Acid Free) du LSR est seule compatible avec la fonction de fixation suivie de dégradation de la leptine. Les immunoglobulines non-spécifiques sont sans effet sur la 25 dégradation de la leptine (Figure 18).

Afin de vérifier la fixation de la leptine au LSR, une colonne de chromatographie contenant de la leptine recombinante a été préparée. Les protéines de membrane plasmique de foie de rat ont été déposées sur cette 30 colonne, et, après lavage, les protéines fixées ont été éluées en présence de glycine pH3. La Figure 19 montre que les anticorps anti-LSR reconnaissent spécifiquement

la sous-unité α qui, après s'être fixée à la leptine, a été relarguée par le tampon glycine.

Des expériences de transfection stable de la sous-unité α (Matériels et Méthodes) permettront de mesurer 5 l'affinité de la leptine pour ce nouveau récepteur.

Ces résultats suggèrent que le LSR représente une des voies de dégradation et d'élimination de la leptine. L'injection *in vivo* de leptine recombinante radio-marquée a montré, tant chez les souris obèses que chez 10 les souris contrôles, une vitesse de clairance rapide et une captation préférentielle de la leptine par le foie et le rein : 50% de la dose injectée est retrouvée après 15 10 minutes dans ces deux organes. Afin d'analyser les mécanismes de captation sélective de la leptine, nous avons comparé les quantités de leptine et de $\beta 2$ microglobuline (protéine soluble de poids moléculaire proche de celui de la leptine, choisie comme contrôle) 20 présentes dans le rein et le foie de souris normales et de deux lignées de souris obèses 5 minutes après injection d'une même dose traceuse de ces deux protéines radio-marquées. Les résultats présentés en Figure 20 montrent que la quantité de leptine sélectivement captée 25 par le foie est diminuée dans les souris obèses, par rapport aux souris contrôles ; par ailleurs, on ne trouve pas de différence entre les différentes lignées pour ce qui concerne la captation rénale de la leptine. Nous avons ensuite montré que le nombre de récepteurs LSR chez des animaux obèses présentant soit un déficit 30 en leptine (*ob/ob*), soit un déficit de l'*ob* récepteur (*db/db*), est diminué significativement (Figure 21). La diminution de la captation hépatique sélective de la leptine chez les souris obèses coïncide avec la

diminution chez ces animaux du nombre apparent de récepteurs LSR. Nous avons enfin testé l'effet d'anticorps anti-LSR sur la distribution de la leptine entre foie et rein, 5 minutes après injection d'une dose 5 traceuse. La captation hépatique de la leptine est diminuée, et la captation rénale est augmentée par les anticorps anti-LSR, en comparaison avec des immunoglobulines contrôles (Figure 22). Ces résultats indiquent donc que le LSR est responsable de la 10 captation hépatique sélective de la leptine et qu'une diminution du nombre de récepteurs est observée chez les animaux obèses. Une telle diminution peut expliquer le syndrome de résistance à la leptine et l'augmentation de la concentration plasmatique de la leptine qui est 15 observée chez la plupart des sujets humains obèses.

Il est également possible que le LSR serve de voie de dégradation pour d'autres cytokines, notamment celles produites par le tissu adipeux. On retiendra particulièrement l'importance du Tumor Necrosis Factor α 20 et du Nerve Growth Factor. Ces deux cytokines exercent un effet amaigrissant significatif lorsqu'elles sont injectées à des sujets humains (Cytokines and their receptors, 1996).

25 **Exemple 5**

Contrôle de l'activité LSR par les cytokines

La sous-unité α du récepteur LSR fixe la leptine et 30 possède des sites potentiels de phosphorylation. Ceci en fait un récepteur qui non seulement médie l'endocytose, mais pourrait servir à la signalisation cellulaire. Nous

avons testé l'hypothèse que la leptine module l'activité du LSR. L'ajout de concentrations croissantes de leptine à des hépatocytes en culture augmente la fixation, l'internalisation et la dégradation des VLDL et des LDL (Figure 23). Cet effet de la leptine est obtenu à travers une augmentation du nombre apparent de récepteurs exprimés à la surface des hépatocytes (Figure 24A). Cette augmentation résulte d'une part d'une augmentation de la synthèse protéique (elle est inhibée partiellement par la cycloheximide, inhibiteur de la synthèse protéique). Elle implique d'autre part la mobilisation des vésicules endocytiques par le système des microtubules (elle est en effet inhibée par la cytochalasine B qui bloque le transport microtubulaire) (Figure 24B).

Afin de vérifier *in vivo* l'effet de la leptine sur l'activité LSR, nous avons caractérisé la réponse triglycéridémique post-prandiale de souris contrôles, ob/ob et db/db, après un repas test de gavage. En accord avec la réduction du nombre de récepteurs LSR observée chez les souris obèses, une amplification de la réponse post-prandiale est également présente chez les souris obèses non traitées. L'administration de leptine par voie intraveineuse en même temps que le repas test permet de réduire la réponse lipémique post-prandiale dans les deux lignées de souris obèses et chez les souris contrôles (Figure 25). Cette diminution de la réponse lipémique induite par la leptine est supprimée par l'administration de lactoferrine (Figure 26), qui bloque l'activité du LSR (Yen et al., 1994 ; Mann et al., 1995).

In vivo aussi, l'administration de leptine induit une augmentation du nombre apparent de récepteurs LSR

exprimés au niveau de la surface des hépatocytes. Cette augmentation est significative, tant chez les souris ob/ob que chez les souris db/db (Figure 27).

La leptine et vraisemblablement d'autres cytokines 5 sont donc régulateurs de l'activité du LSR. Un syndrome de résistance à la leptine, ou à d'autres cytokines, peut entraîner une hypertriglycéridémie, soit permanente, soit limitée à la phase post-prandiale.

10 **Exemple 6**

Identification de la sous-unité γ du LSR

Les sous-unités α et β du LSR ont été identifiées 15 (Exemple 1). L'analyse des produits de traduction des ARNs codant pour ces deux sous-unités ne permet pas d'expliquer la présence d'une troisième sous-unité de poids moléculaire ≈ 35 kDa. Cette dernière n'est détectée qu'après réduction du complexe LSR (Figure 13, ligne 4).

20 Nous avons purifié et obtenu la séquence NH₂ terminale de cette sous-unité γ .

La purification est réalisée par chromatographie d'immunoaffinité (Matériels et Méthodes). Une bande de PM apparent d'environ 35 kDa est identifiée et envoyée 25 pour séquençage selon la méthode Edman.

La séquence obtenue est LHTGDKAFVEFLTDEIKEE. Cette séquence correspond à l'identique à celle d'une protéine de poids moléculaire 33 kDa identifiée précédemment comme une protéine de la surface cellulaire qui fixe les 30 têtes globulaires du C1q (gC1q-R) (Ghebrehiwet et al., 1994). Une observation plus récente indique que ce récepteur potentiel du C1q est localisé également dans

des vésicules situées sous la surface cellulaires (van den Berg et al., 1997). Cette protéine correspond également à une protéine précédemment identifiée comme p34, et qui s'associe à un récepteur de la lamine. Ce récepteur possède un long segment NH₂ terminal orienté vers l'intérieur du noyau cellulaire ainsi que 8 domaines transmembranaires. Ce récepteur se fixe à la lamine d'une façon qui dépend du degré de phosphorylation. Enfin gC1q-R s'associe avec le « splicing factor 2 » (Honoré et al., 1993). Le récepteur de la lamine et le « splicing factor 2 » présente en commun la caractéristique de contenir une séquence répétée de sérine et d'arginine (RSRS) située au niveau du segment NH₂ terminal dans le cas du récepteur de la lamine et au niveau carboxy terminal dans le cas du SF2.

Il est remarquable de constater que tant LSR α que LSR β présentent des segments répétés riches en sérine et arginine (Figure 17). Notre hypothèse est que la protéine LSR γ représente un chaperon moléculaire qui s'associe aux sous-unités α et β du LSR via leur domaine RSRS.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons obtenu des anticorps polyclonaux dirigés contre deux peptides synthétiques dont la séquence était située à l'extrémité carboxy ou NH₂ terminale de la protéine gC1q-R. La Figure 28 montre que ces anticorps inhibent spécifiquement l'activité du LSR. L'anticorps dirigé contre l'extrémité COOH terminale semble le plus efficace.

Ces résultats indiquent que gC1q-R, ou un de ses homologues structurellement proche, représente un chaperon moléculaire associé de façon non covalente au complexe multimérique LSR.

Exemple 7

Régulation de l'activité LSR par le C1q et ses
 5 homologues

Régulation de l'activité LSR par le C1q

Il a été montré que gC1q-R pouvait fixer la tête globulaire du facteur 1 du Complément. Nous avons 10 cherché à utiliser cette propriété du C1q pour déplacer gC1q-R associé au LSR, et avons mesuré l'effet de doses croissantes de C1q sur la fixation, l'internalisation et la dégradation des LDLs par des hépatocytes en culture primaire. La Figure 29 montre une augmentation de la 15 captation et dégradation des LDLs induite par le C1q humain en l'absence d'oléate.

Une augmentation moins importante mais néanmoins significative est également observée en présence d'oléate. Toutefois dans ces conditions, l'effet maximal 20 est obtenu pour des concentrations plus faibles de C1q.

Il apparaît donc que le gC1q-R exerce à l'égard du LSR un effet inhibiteur qui est comparable à celui induit par la 39 kD RAP à l'égard de la LRP, du LDL-récepteur, et du LSR (Troussard et al., 1995). Le déplacement du 25 chaperon gC1q-R en utilisant sa capacité à se fixer au complément C1q permet la levée de l'effet inhibiteur. L'analyse de la séquence de gC1q-R fait apparaître qu'il ne peut s'agir d'un récepteur membranaire typique. En effet, la protéine ne possède pas de séquence hydrophobe 30 susceptible de traverser la bicoche phospholipidique.

L'effet de complément C1q sur l'activité du LSR ouvre des perspectives importantes dans le cadre de la génétique de l'obésité. Il est possible en effet que des

mutations affectant soit le gène du C1q, celui du gC1q-R, soit encore celui de leurs analogues comme par exemple AdipoQ, la cérébelline, le collagène alpha 1-10, SPA et SPD (protéines du surfactant pulmonaire), la 5 protéine se liant au mannane, et le récepteur scavenger ou son homologue la LRP (Hu et al., 1996 ; Drickamer et al., 1986 ; Krieger et Herz, 1994 ; Elomaa et al., 1995) modulent l'activité du LSR, tant vis-à-vis de la clairance des lipoprotéines, que vis-à-vis de celle de 10 la leptine.

Composés analogues de C1q

Plusieurs protéines peuvent interagir avec gC1q-R car elles présentent des homologies avec le complément C1q. 15 En particulier deux protéines isolées chez la souris, AdipoQ (Hu et al., 1996) et acrp30 (Scherer et al., 1995), et une protéine humaine APM1 (Maeda et al., 1996) présentent des homologies marquantes. Ces trois protéines, comme les éléments du complément C1q (C1q A, 20 B, C) sont des protéines secrétées ; elles ont une extrémité NH₂-terminale ressemblant au collagène (répétition de motifs Gly-X-Y) et une extrémité COOH-terminale correspondant au domaine globulaire du complément C1q. Ces trois protéines sont 25 préférentiellement exprimées dans le tissu adipeux. Il n'y a que 3 acides aminés de différence entre AdipoQ et acrp30. APM1, protéine dont le messager a été caractérisé comme étant très exprimé dans des adipocytes, présente 79,7% d'identité en acide nucléique 30 et 80,6% en acide aminé avec AdipoQ. APM1 est donc certainement l'homologue humaine de AdipoQ.

D'autres protéines présentent des domaines globulaires ressemblant au domaine de C1q, en particulier la

cérébelline et la multimérine (isolées chez l'homme), ces deux protéines n'ont pas de domaine ressemblant au collagène. Pour préciser la structure des domaines C1q de ces différentes protéines, ces domaine ont été alignés (Figure 30). Les domaines conservés, signature des domaines C1q sont retrouvés (encadrés sur la figure), deux résidus cystéines en position 172, 179, 178 et 190, 196, 192 respectivement dans C1q A, C1q B et C1q C ne sont pas présents dans les autres domaines globulaires. Ces résidus cystéine sont remplacés dans APM1, AdipoQ et arcp30 respectivement par un résidu lysine et un résidu aspartate ; ces deux acides aminés, dans certaines conditions peuvent établir des ponts salins intra-chaîne permettant de structurer la protéine, ce qui n'est pas permis par les acides aminés retrouvés dans la cérébelline et la multimérine. Il est donc envisageable de caractériser le domaine C1q des protéines produites par les adipocytes par l'absence de cystéines dans la région correspondant aux acides aminés 170-200 des molécules de C1q et par les consensus du domaine C1q.

La comparaison fine des séquences protéiques (domaine collagène, données non présentées) et domaine C1q suggère donc que ces protéines appartiennent à une famille de composés analogues de C1q. Une analyse plus fine permettra probablement de les classifier en sous-groupes selon leurs spécificités, d'expression ou d'activité.

30 **Exemple 8**

Caractérisation de LSR humain

Séquence génomique du LSR humain

Un criblage des banques de données de séquences nucléiques publiques (Genebank, version : 101) aussi bien avec la séquence de lisch7 de souris (N° 5 Accession : U49507) qu'avec celle du LSR-2097 de rat isolée par les inventeurs permet d'isoler deux séquences d'ADN génomique humain. Il s'agit des cosmides dont les numéros d'accession sont AC002128 et AD000684, de tailles respectives 45.328 pb et 41.936 pb. Ces deux

cosmides se recouvrent partiellement. L'extrémité 3' du cosmide AC002128 chevauche sur 12 838 pb l'extrémité 5' du cosmide AD000684. Sur la portion commune de 12 838 pb, les séquences sont identiques à 100%, mises à part 5 deux délétions en positions 822 et 3170 du cosmide AD00684. Le gène du LSR humain est réparti sur les deux cosmides. Pour faciliter l'étude de cette région, une séquence génomique complète a été reconstituée : les 10 45 328 pb du cosmide AC002128 ont été rajoutées à la séquence du cosmide AD000684 comprise entre la base 12 839 et la base 41 936. L'ensemble constitue une séquence de 74 426 pb. Une séquence génomique comprise entre les positions 28 334 à 50 413 couvrant le gène du LSR a été extraite (Figures 31 et 38).

15 Les exons putatifs du gène LSR ont été déterminés après alignement de la séquence ci-dessus décrite (figure 31) avec les séquences des ARNs de Lisch7 de souris et de LSR de rat. La validité des sites d'épissage de part et d'autre des exons putatifs a été 20 vérifiée. Le gène du LSR humain comprend 10 exons répartis sur 21 073 pb. La taille des exons est respectivement de : 245, 335, 120, 57, 147, 174, 60, 132, 626 et 125 pb. Les exons décrits dans les "features" des séquences de Genebank doivent donc être 25 revus selon l'analyse des inventeurs. L'analyse de la séquence a permis de mettre en évidence que le premier exon est localisé en position 30 334 de la séquence AC002128, et comporte 244 pb (et non 151 comme annoté). De même, l'exon 7 que nous décrivons n'a été annoté dans 30 aucune des séquences génomiques déposées.

Les exons 1 et 2 ainsi que 9 et 10 sont nécessairement co-épissés, formant ainsi un bloc 5' correspondant aux exons 1 et 2 et un bloc 3'

correspondant aux exons 9 et 10. Le messager minimal fonctionnel, correspondant au produit de ces quatre exons, aurait ainsi une taille de 1 331 pb. Pour les autres exons, toutes les combinaisons possibles 5 permettent de conserver la phase ouverte de lecture.

L(es) exon(s) non codant(s) en 5' n'ont pas pu être déterminés avec précision. Lisch7 murin est tronqué en 5' et les séquences 5' UTR du rat divergent trop de celles de l'homme pour finaliser l'analyse de ces 10 séquences et identifier la réelle extrémité 5' de l'ADNC de LSR humain. Celle-ci pourra être menée grâce à l'isolement de l'extrémité 5' des messagers LSR humains par les méthodes de capture d'extrémité 5' développées par les inventeurs (WO 96/34981). Le site de 15 polyadénylation décrit, est le seul qui soit présent avant le gène USF2, présent en 3' du gène LSR humain. Il est donc très vraisemblable que la région 3' non traduite de ce gène soit très courte (de taille estimée d'environ 100pb). Toutes les tailles données, concernant 20 les molécules d'ARN messager de LSR humain devront donc être ajustées en fonction de la taille de l'extrémité 5' non traduite. La séquence d'ARN messager humaine obtenue en tenant compte de l'ensemble des exons déduits de l'analyse de la séquence génomique a une taille de 25 2 021 pb ; cette séquence sera par la suite dénommée LSR-Hs-2021. Cette forme correspondrait à la forme LSR-Rn-2097.

Analyse en Northern blot

30 Des sondes nucléiques de LSR de rat ont été utilisées pour réaliser des Northerns blots avec une membrane (Human Multiple Tissue Northern Blot, Clontech #7760-1) comportant des ARNs poly A de Coeur, Cerveau, Placenta,

Poumon, Foie, Muscle squelettique, Rein et Pancréas humains. Une bande d'environ 2 kpb est mise en évidence dans le foie et dans le rein. La quantification approximative des résultats d'hybridation indique que 5 LSR est exprimé dans le foie au moins 5 fois plus que dans le rein.

Clonage du cDNA; étude de la zone d'épissage

De plus, des produits de transcription inverse PCR (RTPCR) ont été isolés. La transcription inverse a été réalisée en amorçant avec un oligo-dT des ARN messagers de foie humain. L'amplification est réalisée avec des amorces sens, de séquence: ATGCAACAGGACGGACTTGGA (positions 5' : 2001 et 3' : 2021 sur la séquence 10 génomique reconstituée), et anti-sens, de séquence: 15 TCAGACGACTAAACTTCCGACTCAGG (positions 5' : 20 981 et 3' : 20 954 sur la séquence génomique reconstituée), respectivement positionnées à l'extrémité 5' de l'exon 1 (au niveau du codon ATG) et à l'extrémité 3' de l'exon 20 10 (au niveau du codon STOP), avec le kit Advantage Tth-polymerase (Clontech) dans les conditions : 1 min à 95°C, puis 35 cycles de 10 sec à 94°, 30 sec à 60° et 2 min à 68°. Deux produits de taille : 1,8 kb et 2 kb sont obtenus après séparation sur gel d'électrophorèse. 25 L'identité des séquences de ces deux produits avec les séquences reproduites Figures 7 et 9, peut être confirmée par séquençage des produits de PCR clonés ainsi que par l'analyse de l'épissage alternatif décrit ci dessous.

30 Les tailles de ces deux produits pouvant s'expliquer par un épissage alternatif similaire à celui décrit chez le rat, des amorces d'amplification ont été dessinées à l'extrémité 5' de l'exon 3 (amorce sens : 5' -

TCGTGACCTGACCTTGACCAGAC-3') et à l'extrémité 5' de l'exon 6 (amorce anti-sens : 5'-CCTGAGCTACTCCTGTCAACGTCT-3'). Des transcription inverse-PCR ont été réalisées sur des ARN de foie. Un produit 5 de PCR présentant deux bandes de tailles approximatives 180 et 350 nucléotides a été obtenu. Les deux bandes ont été isolées, clonées et séquencées. La séquence de la bande d'environ 350 pb indique que la forme à partir de laquelle elle est obtenue comprend les exons 3, 4, 5 et 10 6 ; l'ARNm correspondant serait LSR-Hs-2021, correspondant à LSR-Rn-2097. La bande d'environ 180 pb correspond à une forme joignant l'exon 3 à l'exon 6. La forme d'ARN messager correspondant, contenant tous les exons sauf le 4 et le 5, aurait une taille de 1817 pb, 15 et sera par la suite dénommée LSR-Hs-1817. Cette forme correspondrait à la forme LSR-Rn-1893.

En outre, les formes d'ARN LSR mises en évidence chez le rat s'expliquent bien par les différentes combinaisons d'épissage possibles à partir de la structure génomique 20 de LSR. Ainsi, la forme LSR-Rn-2097 serait la forme correspondant à la totalité des exons (équivalent de la forme LSR-Hs-2021 mise en évidence chez l'homme, Figure 7) ; la forme 2040, correspondrait à un messager d'où seul manque l'exon 4 (pour l'instant nous n'avons pas 25 mis en évidence de forme humaine correspondante), la forme LSR-Rn-1893 correspondrait à la forme LSR-Hs-1817 mise en évidence chez l'homme (Figure 9).

Cette analyse permet de conclure à l'existence, chez 30 l'homme, de deux formes du LSR équivalentes aux formes LSR 66 et LSR 58 du rat. Une analyse plus systématique des produits de transcription permettra d'établir l'existence potentielle d'autres produits issus d'épissage alternatif du gène LSR chez l'homme.

Allongement de l'exon 1 en 5' et précision des sites d'épissage entre les exons 1 et 2

Des expériences additionnelles de transcription inverse-PCR sur l'ARNm ont permis d'augmenter la taille de l'exon 1 du côté 5' et de préciser les sites d'épissage entre les exons 1 et 2. Ainsi, l'exon 1 a été allongé de 97 pb du côté 5'. Toutefois, cette extrémité ne constitue pas le début de cet exon. En outre, il existe un deuxième site d'initiation dans l'exon 1 qui se trouve plus en aval du premier et qui présente une probabilité plus grande que celui-ci.

Afin de continuer l'étude des phénomènes d'épissage alternatif, des amorces d'amplification ont été dessinées dans l'exon 2 (amorce sens 5'-CTACAACCCCTACGTTGAGT-3') et à l'extrémité 5' de l'exon 9 (amorce anti-sens 5'-AGGCCGAGATGCCAGTCGT-3'). Des transcriptions inverse-PCR ont été réalisées sur des ARN de foie.

D'une part, ces expériences ont permis de constater que l'épissage entre les exons 1 et 2 était différent entre l'ARN humain et celui de rat. En effet, les sites sont déplacés de 8 pb en 3' de l'exon 1 et de 10 pb en 5' de l'exon 2. Cette modification des sites d'épissage provoque une insertion de 6 acides aminés consécutifs à l'interface de ces deux exons par rapport à la séquence précédemment décrite.

D'autre part, ces expériences ont permis de mettre en évidence les trois différents ARNm issus de l'épissage alternatif. En effet, un produit de PCR présentant deux bandes majeures de taille approximative 750 et 600 nucléotides et une mineure de 800 nucléotides environ a été obtenu. Les deux bandes majeures ont été clonées et

séquencées. La séquence de la bande de 750 pb environ indique que la forme à partir de laquelle elle est obtenue comprend les exons 2, 3, 5, 6, 7, 8 et 9. La bande d'environ 600 pb correspond à une forme comprenant 5 les exons 2, 3, 6, 7, 8 et 9. Pour rechercher si la bande mineure pouvait correspondre à une forme contenant l'exon 4, de nouvelles amorces ont été dessinées dans l'exon 3 (amorce sens 5'-ACAATGAGGCCTACGCAGA-3') et dans l'exon 5 (amorce anti-sens 5'-CAGGGCACCTGACGTAGCA-3'). 10 Un produit de PCR présentant deux bandes de taille approximative 150 et 200 nucléotides a été obtenu. Les deux bandes ont été clonées et séquencées. La séquence de la bande de 150 pb environ indique que la forme à partir de laquelle elle est obtenue comprend les exons 3 15 et 5. La bande d'environ 200 pb correspond à une forme comprenant les exons 3, 4 et 5.

La figure 38 illustre la séquence génomique du gène LSR humain avec l'allongement en 5' de l'exon 1 et la précision des sites d'épissage entre les exons 1 et 2. 20 Suite à ces modifications, les exons 1 et 2 présentent des longueurs différentes de celles annoncées dans l'exemple 8 qui sont respectivement de 350 et 345 pb. Ainsi, en tenant compte de ces modifications, l'ARNm contenant les exons 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 est 25 appelé LSR-Hs-2062 et est illustré à la figure 39. Il correspond à l'ARNm nommé précédemment LSR-Hs-2021. L'ARNm contenant les exons 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 et 10 est appelé LSR-Hs-2005 et est illustré à la figure 41. 30 Cet ARNm correspond à celui nommé précédemment LSR-Hs-1964. Enfin, l'ARNm contenant les exons 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 et 10 est appelé LSR-Hs-1858 et est illustré à la figure 43. Il correspond à celui nommé précédemment LSR-

Hs-1817. Ces trois formes biologiques d'ARNm correspondent bien à ce qui a été observé chez le rat. Les séquences des protéines codées par les ARNm LSR-Hs-2062, LSR-Hs-2005 et LSR-Hs-1858 sont illustrées 5 respectivement dans les figures 40, 42 et 44. Les séquences protéiques biologiques peuvent commencer au premier codon ATG observé dans la phase de lecture (position 35 de la séquence protéique). Cependant, le codon d'initiation de la traduction préféré se trouve 10 plus en aval en position 83 de la séquence protéique. De plus, il est tout à fait possible que ce codon initiateur soit plus en amont dans la région 5' de l'exon 1 non encore déterminé ou dans un éventuel exon précédent celui-ci.

15 Enfin, la figure 45 présente une représentation schématique des différentes formes de protéines mises en évidence chez l'homme en indiquant les motifs conservés.

Clonage de l'ADNc du LSR de souris ; analyse des 20 produits de l'épissage alternatif.

Le clonage de l'ADNc du LSR de souris a été réalisé à partir d'une banque d'ARNm de foie de souris. La méthode de clonage utilisée est la même que pour l'ADNc du LSR humain. Les ARNm ont été purifiés et une amplification 25 par transcription inverse par PCR avec les amorces d'ADN spécifiques a été réalisée. Le fragment d'amplification a été cloné dans un vecteur de clonage TA (Introgene). Une étude des produits de l'épissage alternatif avec des amorces situées dans l'exon 2 et dans l'exon 9 a 30 également été réalisée de manière similaire à celle effectuée pour le LSR humain.

Trois produits de l'épissage alternatif ont été observés : LSR-Mm-1886, LSR-Mm-1829 et LSR-Mm-1682. LSR-

Mm-1886 contient tous les exons de 1 à 10. LSR-Mm-1829 et LSR-Mm-1682 sont dénués des exons 4 et des exons 4 et 5, respectivement. Ces trois formes biologiques d'ARNm correspondent bien à ce qui a été observé chez l'homme et le rat. Les séquences nucléotidiques des ARNm LSR-Mm-1886, LSR-Mm-1829 et LSR-Mm-1682 sont illustrées dans les figures 46, 47 et 48, respectivement. Les séquences protéiques codées par les ARNm LSR-Mm-1886, LSR-Mm-1829 et LSR-Mm-1682 sont illustrées dans les figures 49, 50 et 51.

Comparaison et analyse des séquences LSR

a) Comparaison et analyse des séquences LSR avant allongement de l'exon 1 en 5' et précision des sites d'épissage entre les exons 1 et 2 pour les séquences humaines et avant analyse des produits de l'épissage alternatif pour les séquences murines.

La séquence de LSR-Hs-2021 et la séquence de LSR-Rn-2097 sont identiques à 78,6% sur 1931 pb chevauchantes. Ces chiffres sont respectivement de 78,8% et 1935 pb lorsque la séquence de Lisch7 murine est alignée avec la séquence humaine. Cela traduit une très grande conservation des séquences nucléiques entre espèces. Les plus grandes divergences sont observées dans l'extrémité 5' non traduite (quand la séquence est disponible), dans le premier exon codant et dans l'extrémité 3' non traduite (Figure 32).

La séquence protéique déduite de la séquence de LSR-Hs-2021 aurait une longueur de 643 acides aminés. Elle est alignée avec les séquences protéiques de Lisch7 et LSR-Rn-2097 (Figure 33). La conservation des séquences protéiques est très grande (respectivement 77,5% et 84,2% d'identité).

Les domaines fonctionnels mis en évidence dans la séquence protéique du LSR de rat se retrouvent dans la séquence LSR humaine ainsi que dans celle de Lisch7 murin (Figure 33). La protéine humaine correspondant à 5 la forme LSR-Hs-1817 aurait 575 acides aminés. L'alignement de ces deux formes humaines avec les trois formes décrites chez le rat (Figure 34) montre que toutes les formes protéiques conservent le signal NPGY de fixation à la clathrine et la signature RSRS 10 d'interaction avec gC1q-R. Les formes longues humaine (produit de LSR-Hs-2021) et de rat (produit de LSR-Rn-2097) présentent l'ensemble des caractéristiques fonctionnelles du LSR. Les deux formes courtes (produits respectifs de LSR-Hs-1817 et LSR-Rn-1893) perdent le 15 domaine di-leucine d'adressage lysosomal, le domaine transmembranaire et la signature de récepteur à cytokine. La Figure 35 représente enfin les deux formes mises en évidence chez l'homme, et les motifs que porte chacune d'elle en conséquence de l'épissage dont elle 20 est issue.

b) Comparaison et analyse des séquences LSR après allongement de l'exon 1 en 5' et précision des sites d'épissage entre les exons 1 et 2 pour les séquences humaines et après analyse des produits de l'épissage 25 alternatif pour les séquences murines.

La séquence de LSR-Hs-2062 et la séquence de LSR-Rn-2097 sont identiques à 78,6 % sur 1 955 pb chevauchantes. Ces chiffres sont respectivement de 78,8 % et 1 851 pb lorsque la séquence de LSR-Mm-1886 30 murine (forme longue) est alignée avec la séquence humaine. Cela traduit une très grande conservation des séquences nucléiques entre espèces. Les plus grandes divergences sont observées dans l'extrémité 5' non

traduite (quand la séquence est disponible), dans le premier exon codant et dans l'extrémité 3' non traduite (Figure 53).

La séquence protéique déduite de la séquence de LSR-Hs-2062 aurait une longueur de 649 acides aminés. Elle est alignée avec les séquences protéiques de LSR-Mm-1886 et LSR-Rn-2097 (Figure 54). La conservation des séquences protéiques est très grande (respectivement 80,2 % et 82,2 % d'identité pour 591 et 590 acides aminés chevauchants).

Les domaines fonctionnels mis en évidence dans la séquence protéique du LSR de rat se retrouvent dans la séquence LSR humaine ainsi que dans celle de LSR-Mm-1886 murin (Figure 54). Les protéines humaines correspondant aux formes LSR-Hs-2005 et LSR-Hs-1858 auraient 630 et 581 acides aminés respectivement. L'alignement des trois formes humaines (figure 54) des trois formes décrites chez le rat (Figure 56) et des trois formes décrites chez la souris (figure 58) montre que toutes les formes protéiques conservent le signal NPGY de fixation à la clathrine et la signature RSRS d'interaction avec gC1q-R. Les formes longues humaines (produit de LSR-Hs-2062), de rat (produit de LSR-Rn-2097) et de souris (produit de LSR(Mm-1886) présentent l'ensemble des caractéristiques fonctionnelles du LSR. Les trois formes courtes (produits respectifs de LSR-Hs-1817, LSR-Rn-1893 et LSR-Mm-1682) perdent le domaine di-leucine d'adressage lysosomal, le domaine transmembranaire et la signature de récepteur à cytokine. On peut également remarquer que les trois formes intermédiaires (produit de LSR-Hs-2005, de LSR-Rn-2040 et LSR-Mm-1829) perdent le domaine di-leucine, le domaine transmembranaire, le domaine correspondant à la signature du récepteur à cytokine étant conservé

(figures 54, 56 et 58). La Figure 54 représente enfin les trois formes mises en évidence chez l'homme, et les motifs que porte chacune d'elle en conséquence de l'épissage dont elle est issue.

5 Enfin, il est intéressant de noter qu'une synthénie (conservation de l'organisation de certaines régions chromosomiques entre espèces) entre la région du chromosome 7 de la souris où est localisé le gène de Lisch7, à proximité immédiate de USF2, et la région 10 19q13 du chromosome 19 humain, portant le LSR, est bien décrite. L'organisation des deux gènes Lisch7/LSR et USF2 est conservée entre espèces. De même, de localisation plus centromérique par rapport à ces gènes, se trouve Apo E, aussi bien chez la souris que chez 15 l'homme. Il est remarquable que le récepteur aux lipoprotéines LSR, et un de leurs ligands ApoE, soient localisés dans une même région chromosomique. En effet, il est fréquent que le récepteur et le ligand soient co-régulés. Une telle situation permettrait d'envisager 20 que des phénomènes observés chez la souris soient transposables chez l'homme.

En conclusion, la similarité de séquence et de structure de LSR décrite ci-dessus permet donc d'extrapoler à l'homme les observations réalisées chez le rat. Nous 25 avons toutefois cherché à démontrer la validité de cette conclusion.

Exemple 9

30 Activité LSR chez l'homme

Des cultures primaires de fibroblastes humains isolés à partir de sujets présentant une délétion de

affectant promoteur et premier exon du gène du LDL récepteur ont été obtenues. L'incubation de ces cellules en présence et en absence d'oléate montre que celui-ci induit une activité de fixation, internalisation et 5 dégradation de LDL qui suit une cinétique de saturation (Bihain et Yen, 1992). L'affinité de ce récepteur induit par l'oléate est maximale pour les particules riches en triglycérides (VLDL et chylomycrons) ainsi que pour des particules de trioléine et phosphatidylcholine 10 supplémentées avec de l'apoprotéine E recombinante. L'affinité des LDL pour le récepteur est plus faible que celle des VLDL et des chylomicrons mais toutefois plus élevée que celles de particules de trioléine, phosphatidylcholine ne contenant pas d'ApoE, ou que 15 celles de VLDL isolés à partir d'un sujet présentant une hyperlipidémie de type III et le phénotype E2/2 de l'Apo E (Yen et al., 1994).

L'activité du LSR est également présente dans les fibroblastes de sujets humains normaux (Figure 36).

20

Exemple 10

Effet de la leptine sur l'activité LSR chez l'homme

25 L'activité LSR de fibroblastes humains FH (familial hypercholesterolemia) est également augmentée après incubation avec de la leptine (Figure 37), suggérant que tout comme chez le rat, le LSR participe chez l'homme à la clairance des cytokines, et voit son activité modulée 30 par celles-ci.

Exemple 11

Le complexe LSR, récepteur hépatique aux lipoprotéines et à la leptine : applications

Clairance des lipoprotéines

5 Le récepteur LSR représente la voie principale de l'élimination des lipoprotéines d'origine intestinale et des particules riches en triglycérides. Le récepteur LSR peut aussi servir de voie accessoire pour l'élimination des LDL, particules riches en cholestérol, qui sont pour 10 la plus grande part épurées par la voie du LDL récepteur, mais dont environ 30% sont éliminées au niveau hépatique par des voies différentes du LDL récepteur.

15 *Clairance de la leptine*

En absence d'acides gras libres, le récepteur LSR fixe, non pas les lipoprotéines, mais une cytokine, la leptine. La fonction de clairance de la leptine n'est possible que si le récepteur n'a pas fixé d'acides gras 20 produits par la lipase hépatique ou par la lipase hormono-sensible du tissus adipeux.

Conséquences de cette double fonction

Les taux élevés de leptine chez les sujets humains 25 obèses peuvent s'expliquer par plusieurs mécanismes moléculaires qui sont susceptibles de diminuer la clairance hépatique de la leptine, dont notamment :
 a) une altération d'un (des) gène(s) du LSR, et/ou de leur(s) promoteur(s) ;
 30 b) une facilitation, par des modifications post-transcriptionnelles, du remaniement allostérique permettant le passage de la conformation cytokine-

compétente à la conformation de récepteur aux lipoprotéines ;

c) un déficit de transport des vésicules contenant le LSR de, ou vers, la membrane plasmique (cette fonction 5 dépend de l'intégrité du cytosquelette) ;

d) une augmentation de la dégradation du LSR ;

e) une augmentation de la ration calorique lipidique qui, en détournant le récepteur vers la clairance des lipoprotéines, réduit en partie sa capacité de dégrader 10 la leptine.

Traitements de l'obésité

Le rôle joué par le LSR dans la clairance de la leptine permet de formuler un modèle physiopathologique qui 15 impose une révision des stratégies mises en oeuvre pour traiter l'obésité. Il est en effet essentiel de réduire les concentrations de leptine chez les sujets humains obèses, afin de restaurer les fluctuations physiologiques de cette hormone.

20 C'est pourquoi il est possible d'envisager d'utiliser des composés pour le traitement de l'obésité permettant la modulation du nombre de récepteurs LSR, de leur vitesse de recyclage, ou du changement de leur conformation, et/ou permettant notamment :

25 1. de contrôler la leptinémie, et donc les sensations de satiété et de faim ;

2. de restaurer des concentrations de leptine normales et de permettre la régulation normale du comportement alimentaire par la perception normale des sensations de 30 faim et de satiété ;

3. de contrôler la triglycéridémie ;

4. de réguler les concentrations plasmatiques de résidus de chylomicrons, particules très athérogènes.

Traitements de l'anorexie et de la cachexie

Il est possible d'envisager d'utiliser des méthodes de régulation des activités du LSR pour mettre en place des 5 traitements permettant de vaincre le cercle vicieux qui caractérise l'anorexie nerveuse. En réduisant le nombre de récepteurs, on devrait favoriser la prise de poids chez les sujets anorexiques ou dénutris.

Dans ces conditions, il est intéressant d'inhiber 10 sélectivement la clairance de la leptine en utilisant des peptides synthétiques ou molécules pharmacologiques qui, soit diminuent la synthèse du LSR, soit bloquent sa capacité à fixer la leptine et/ou les lipoprotéines, soit encore, augmentent le catabolisme du récepteur.

Exemple 12Le complexe LSR, récepteur aux lipoprotéines et aux cytokines : applications

5

L'analyse de la structure primaire du LSR α met en évidence un site homologue aux sites de fixation des cytokines présents sur leurs récepteurs, ainsi que deux signaux de routage qui permettent l'endocytose et la 10 dégradation rapide des ligands dans les lysosomes. Cette observation est originale dans le sens où les récepteurs aux cytokines ne permettent pas l'internalisation et la dégradation des ligands. Ces récepteurs ont été caractérisés sur la base de leur propriété de 15 signalisation intracellulaire. Le LSR présente la propriété de permettre la dégradation protéolytique des lipoprotéines et de la leptine ; il est hautement probable qu'il réalise également la dégradation d'autres cytokines. Cette fonction pourra être étudiée grâce aux 20 anticorps anti-LSR et à des cellules CHO transfectées exprimant la sous-unité α du LSR. L'implication du LSR dans la clairance des cytokines est essentielle car ces moléules jouent un rôle important dans la régulation du 25 métabolisme des lipides, du métabolisme du glucose, et dans la régulation de la prise alimentaire et de la prise de poids.

Les mécanismes moléculaires par lesquels les cytokines modulent les fonctions physiologiques impliquées dans l'obésité et ses complications sont nombreux et 30 complexes. On retiendra cependant le fait que les anomalies du métabolisme des cytokines sont associés à l'hypertriglycéridémie qui accompagne fréquemment les

infections virales, bactériennes ou à protozoaires. Par ailleurs, les cytokines et plus particulièrement le Tumor Necrosis Factor (TNF), induisent une hypertriglycéridémie transitoire semblable à celle 5 observée dans certaines formes de diabètes associés à l'obésité.

La réduction du nombre de récepteurs LSR exprimés au niveau du foie des souris obèses pourrait expliquer un déficit de l'élimination de certaines cytokines, ce 10 déficit entraînant des perturbations métaboliques telles que celles retrouvées dans l'obésité.

L'utilisation de cellules hépatiques en culture, et des différentes modèles d'animaux obèses cités précédemment, permettra de déterminer, parmi toutes les cytokines et 15 plus particulièrement celles qui induisent une perte de poids (IL-6, LIF, OSM, CNTF, IL-11, IL-12 α , ainsi que TNF α et TNF β), celles qui modulent l'expression et/ou l'activité du LSR.

Enfin, l'analyse de la structure primaire du LSR α met 20 en évidence des sites potentiels de phosphorylation. Ceci ouvre la perspective d'une régulation de l'activité cellulaire par le récepteur LSR. Un exemple particulièrement important serait l'implication du LSR dans la régulation de la production de « Accute Phase 25 Proteins » sous l'impulsion de différentes stimuli, dont les cytokines.

L'implication du LSR dans la clairance et la dégradation des cytokines pourrait en outre ne pas se limiter au foie. En effet, s'il est démontré que l'expression du 30 LSR est de façon prédominante hépatique, il est également certain que l'expression de ce récepteur n'est pas limitée à cet organe. Une analyse préliminaire en

Northern blot sur différents tissus humains a pu mettre en évidence, outre les produits hépatiques, des produits d'expression au niveau du rein et du testicule. Une analyse plus approfondie permettra de mettre en évidence 5 les différents tissus exprimant le LSR chez l'homme. Dans cette perspective, le LSR pourrait intervenir dans la dégradation de cytokines non seulement au niveau hépatique, mais aussi au niveau des tissus périphériques. Un déficit de cette activité pourrait 10 être impliqué dans la pathogénie de maladies auto-immunes, de scléroses an plaques, de l'arthrite rhumatoïde. Une accumulation de cytokines est fréquemment retrouvée dans la pathogénie de ces maladies.

15

REFERENCES

Aalto-Setälä, K., Fisher, E.A., Chen, X., Chajek-shaul, T., Hayek, T., Zechner, R., Walsh, A., Ramakrishnan, R.,
5 Ginsberg, H.N., and Breslow, J.L. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice -Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles. *J.Clin.Invest.*
10 90 : 1889-1900, 1992.

Banner, D.W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H.-J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. Crystal structure of the soluble human 55
15 kd TNF receptor-human TNF β complex: Implications for TNF receptor activation. *Cell* 73: 431-445, 1993.

Bartles, J.R., and Hubbard, A.L. Biogenesis of the rat hepatocyte plasma membrane. *Methods Enzymol.* 191 : 825-
20 841, 1990.

Belcher, J.D., Hamilton, R.L., Brady, S.E., Hornick, C.A., Jaeckle, S., Schneider, W.J., and Havel, R.J. Isolation and characterization of three endosomal
25 fractions from the liver of estradiol-treated rats. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84 : 6785-6789, 1987.

Bihain, B.E., and Yen, F.T. Free fatty acids activate a high-affinity saturable pathway for degradation of low-density lipoproteins in fibroblasts from a subject homozygous for familial hypercholesterolemia. *Biochemistry* 31 :4628-4636, 1992.

Bilheimer, D.W., Eisenberg, S., and Levy, R.I. The metabolism of very low density lipoprotein proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 260 : 212-221, 1972.

5 Brendel, V., Bucher, P., Nourbakhsh, I., Blaisdell, B.E., and Karlin, S. Methods and algorithms for statistical analysis of protein sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2002-2006, 1992.

10 Buckholz, R.G. Yeast systems for the expression of heterologous gene products. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 538-542, 1993.

15 Carter, B.J. Adeno-Associated Virus vectors. *Curr. Op. Biotechnology* 3 : 533-539, 1993.

20 Chen, W.-J., Goldstein, J.-L., and Brown, M.S. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J. Biol. Chem.* 263: 3116-3123, 1990.

25 Chen, H., Charlat, O., Targlia, L.A., et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor : identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 84 : 491-495, 1996.

30 Cherif D., Julier, C., Delattre, O., Derré, J., Lathrop, G.M., and Berger, R. Simultaneous localization of cosmid and chromosome R-banding by fluorescence microscopy - Applications to regional mapping of chromosome 11. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87 : 6639-6643, 1990.

Chumakov, I., Rigault, P., Guillou, S., Ougen, P., Billault, A., Guasconi, G., Gervy, P., Le Gall, I., Soularue, P., Grinas, P., et al. Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 5 21q. *Nature* 359 : 380-386, 1992.

Chumakov, I.M., Rigault, P., Le Gall, I., et al. A YAC contig map of the human genome. *Nature* 377 : 175-183, 1995.

10 Compton, J. Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Nature* 350: 91-92, 1991.

15 Cytokines and Their Receptors (Nicola, N.A., ed.). Oxford University Press, Oxford. 1996.

Davis, C.G., Lehrman, M.A., Russell, D.W., Anderson, R.G.W., Brown, M.S., and Goldstein, J.L. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia : amino acid 20 substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell* 45 : 15-24, 1986.

Drickamer K, Dordal, M.S., and Reynolds L. Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain 25 carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein. *J. Biol. Chem.* 261 (15) : 6878-6887, 1986.

30 Edwards, C.P., and Aruffo, A. Current applications of COS cell based transient expression systems. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 558-563, 1993.

Elomaa, O., Kangas, M., Sahlberg, C., Tuukkanen, J., Sormunen, R., Liakka, A., Thesleff, I., Kraal, G., and Tryggvason, K. Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* 80 (4) : 603-609, 1995.

Epstein, A. Les vecteurs herpétiques pour le transfert de gènes. *Médecine/Sciences* 8 : 902-911, 1992.

10 Fan, J.L., McCormick, S.P.A., Krauss, R.M., Taylor, S., Quan, R., Taylor, J.M., and Young, S.G. Overexpression of human apolipoprotein B-100 in transgenic rabbits results in increased levels of LDL and decreased levels of HDL. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 15 : 1889-1899, 1995.

20 Ghebrehiwet, B., Lim, B.-L., Peerschke, E.I.B., Willis, A.C., and Reid, K.B.M. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kd cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q. *J. Exp. Med.* 179: 1809-1821, 1994.

25 Goldstein, J.L., Basu, S.K., and Brown, M.S. Receptor-mediated endocytosis of low-density lipoprotein in cultured cells. *Methods Enzymol.* 98 : 241-260, 1983.

30 Goldstein, J.L., Hobbs, H.H., Brown, M.S. Familial Hypercholesterolemia In The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease, Volume II, 7th Edition (Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., ed). Mc Graw-Hill, New-York. pp.1981-2030, 1995.

Guatelli J.C. et al. Isothermal in vitro amplification of nucleic acids by a multienzyme reaction modeled after retroviral replication. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874-1878, 1990.

5 Gura T. Obesity sheds its secrets. Science 275 : 751-753, 1997.

10 Heldin, C.H. Dimerization of cell surface receptors in signal transduction. Cell 80 : 213-223, 1995.

15 Herz, J., Hamann, U., Rogne, S., Myklebost, O., Gausepohl, H., and Stanley, K.K. Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. EMBO J. 7 : 4119-4127, 1988.

20 Herz, J., Qiu, S.-Q., Oesterle, A., DeSilva, H.V., Shafi, S., and Havel, R.J. Initial hepatic removal of chylomicron remnants is unaffected but endocytosis is delayed in mice lacking the low density lipoprotein receptor. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92 : 4611-4615, 1995.

25 Homanics, G.E., de Silva, H.V., Osada, J., Zhang, S.H., Wong, H., Borensztajn, J., and Maeda, N. Mild dyslipidemia in mice following targeted inactivation of the hepatic lipase gene. J.Biol.Chem. 270 : 2974-2980, 1995.

30 Honoré, B., Madsen, P., Rasmussen, H.H., Vandekerckhove, J., Celis, J.E., and Leffers, H. Cloning and expression of a cDNA covering the complete coding region of the P32

subunit of human pre-mRNA splicing factor SF2. Gene
134 : 283-287, 1993.

5 Hu, E., Liang, P., and Spiegelman B.M. AdipoQ Is a Novel
Adipose-specific Gene Dysregulated in Obesity.
J.Biol.Chem. 271 : 10697-10703, 1996.

10 Huang, Y.D., Schwendner, S.W., Rall, S.C., and Mahley,
R.W. Hypolipidemic and hyperlipidemic phenotypes in
transgenic mice expressing human apolipoprotein E2.
J.Biol Chem. 271 : 29146-29151, 1996.

15 Huynh, T.U., Young R.A. and Davis R.W. DNA cloning
techniques: A practical approach, ed Glover D. (IRL
Press, Oxford), 1984.

20 Iida, M., Murakami, T., Ishida, K., Mizuno, A.,
Kuwajima, M., and Shima, K. Substitution at codon 269
(glutamine>proline) of the leptin receptor (OB6R° cDNA
is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa)
rat. Biochem. Biophys. Res. Commun. 224 : 597-604, 1996.

25 Ishibashi, S., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Gerard,
R.D., Hammer, R.E., and Herz, J. Hypercholesterolemia
in low density lipoprotein receptor knockout mice and
its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. J.
Clin. Invest. 92 : 883-893, 1993.

30 Ito, Y., Azrolan, N., O'Connell, A., Walsh, A., and
Breslow, J.L. Hypertriglyceridemia as a result of human
apoCIII gene expression in transgenic mice. Science 249:
790-793, 1990.

Kleyn, P.W., Fan, W., Kovats, S.G., et al. Identification and characterization of the mouse obesity gene tubby : a member of a novel gene family. *Cell* 85 : 281-290, 1996.

5

Kobayashi, J., Applebaum-Bowden, D., Dugi, K.A., Brown, D.R., Kashyap, V.S., Parrott, C., Duarte, C., Maeda, N., and Santamarina-Fojo, S. Analysis of protein structure-function in vivo. Adenovirus-mediated transfer of 10 lipase lid mutants in hepatic lipase-deficient mice. *J.Biol.Chem.* 271 : 26296-26301, 1996.

Köhler et Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 15 256, 495-497, 1975.

Kosak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15: 8125-8148, 1987.

20

Kosak M. Downstream secondary structure facilitates recognition of initiation codons by eucaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 8301-8305, 1990.

25

Krainer, A.R., Mayeda, A., Kozak, D., and Binns, G. Functional expression of cloned human splicing factor SF2 : homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and drosophila splicing regulators. *Cell* 66 : 383-394, 1991.

30

Krieger, M., and Herz, J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: Macrophage scavenger

receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Ann. Rev. Biochem.* 63: 601-637, 1994.

Landegren U., Kaiser R., Sanders J. & Hood L.A ligase-mediated gene detection technique. *Science* 241: 1077-1080, 1988.

Lee, M.G-S., Bihain, B.E., Russell, D.G., Deckelbaum, R.J., and Van Der Ploeg, L.H.T. Characterization of a cDNA encoding a cysteine-rich cell surface protein located in the flagellar pocket of the protozoan *trypanosoma brucei*. *Molec. Cell. Biol.* 10 : 4506-4517, 1990.

Letourneur, F., and Klausner, R.D. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell* 69 : 1143-1157, 1992.

Lu, D., Willard, D., Patel, I.R., et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating hormone receptor. *Nature* 371 : 799-802, 1994.

Luckow, V.A. Baculovirus systems for the expression of human gene products. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 564-572, 1993.

Maeda, N., Li, H., Lee, D., Oliver, P., Quarfordt, S.H., and Osada, J. Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridemia and protection from postprandial hypertriglyceridemia. *J.Biol.Chem.* 269 : 23610-23616, 1994.

Maeda, K., Okubo, K., Shimomura, I., Funahashi, T., Matsuzawa, Y. and Matsubara, K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1).
5 Biochem. Biophys. Res. Commun. 221(2): 286-289, 1996.

Mann, C.J., Khallou, J., Chevreuil, O., Troussard, A.A., Guermani, L.M., Launay, K., Delplanque, B., Yen, F.T., and Bihain, B.E. Mechanism of activation and functional
10 significance of the lipolysis-stimulated receptor. Evidence for a role as chylomicron remnant receptor. Biochemistry 34 : 10421-10431, 1995.

Manne, J., Argeson, A.C., Siracusa, L.D. Mechanisms for
15 the pleiotropic effects of the agouti gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 : 4721-4724, 1995.

Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E.,
20 Mohammed, S.N., Hurst, J.A., Cheetham, C.H., Earley, A.R., Barnett, A.H., Prins, J.B., and O'Rahilly, S.O. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. Nature 387 :903-908, 1997.
25
No D., Yao T.P. and Evans R.M. Ecdysone-Inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93: 3346-3351, 1996.

30 Nobben-Trauth, K., Naggert, J.K., North, M.A., and Nishina, P.M. A candidate gene for the mouse mutation tubby. Nature 380 : 534-538, 1996.

Olins, P.O., and Lee, S.C. Recent advances in heterologous gene expression in *E. coli*. *Curr. Op. Biotechnology* 4 : 520-525, 1993.

5 Oukka, M., André, P., Turmel, P., Besnard, N., Angevin, V., Karlsson, L., Trans, PL., Charron, D., Bihain, B., Kosmatopoulos, K., Lotteau, V. Selectivity of the major histocompatibility complex class II presentation pathway of cortical thymic epithelial cell lines. *Eur. J. Immunol.* 27 : 855-859, 1997.

10 Parra-Lopez, C.A., Lindner, R., Vidavsky, I., Gross, M., and Unanue, E.R. Presentation on class II MHC molecules of endogenous lysozyme targeted to the endocytic pathway. *J. Immunol.* 158 : 2670-2679, 1997.

15 Perricaudet, M., Stratford-Perricaudet, L. and Briand, P. La thérapie génique par adénovirus. *La Recherche* 23 : 471-473, 1992.

20 Plump, A.S., Smith, J.D., Hayek, T., Aalto-Setälä, K., Walsh, A., Verstuyft, J.G., Rubin, E.M., and Breslow, J.L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71 : 343-353, 1992.

25 Purcellhuynh, D.A., Farese, R.V., Johnson, D.F., Flynn, L.M., Pierotti, V., Newland, D.L., Linton, M.F., Sanan, D.A., and Young, S.G. Transgenic mice expressing high levels of human apolipoprotein B develop severe atherosclerotic lesions in response to a high-fat diet. *J.Clin.Invest.* 95 : 2246-2257, 1995.

Rohlmann, A., Gotthardt, M., Willnow, T.E., Hammer, R.E., and Herz, J. Sustained somatic gene inactivation by viral transfer of Cre recombinase. *Nature Biotech.* 14 : 1562-1565, 1996.

5

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular cloning : a laboratory manual.* Sec. Ed. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York.

10 Scherer, P.E., Williams, S., Fogliano, M., Baldini, G. and Lodish, H.F. A Novel Serum Protein Similar to Clq, Produced Exclusively in Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 270 : 26746-26749, 1995.

15 Simos, G., Georgatos, S.D. The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Letters* 346 : 225-228, 1994.

20 Suggs S.V., Wallace R.B., Hirose T., Kawashima E.H. and Itakura K. Use of oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human $\beta 2$ microglobulin. *PNAS* 78: 6613-6617, 1981.

25 Temin, H.M. Retrovirus vectors for gene transfer. In Kucherlapati R., ed. *Gene Transfer*, New York, Plenum Press, 149-187, 1986.

30 Troussard, A.A., Khalou, J., Mann, C.J., André, P., Strickland, D.K., Bihain, B.E., and Yen, F.T. Inhibitory effect on the lipolysis-stimulated receptor

of the 39-kDa receptor-associated protein. *J. Biol. Chem.* 270 : 17068-17071, 1995.

5 van den Berg, R.H., Prins, F., Faber-Krol, M.C., Lynch, N.J., Schwaebel, W., van Es, L.A., and Daha, M.R. Intracellular localization of the human receptor for the globular domains of C1q. *J. Immunol.* 158 : 3909-3916, 1997.

10 Verhey, K.J., and Birnbaum, M.J. A leu-leu sequence is essential for COOH-terminal targeting signal of GLUT4 glucose transporter in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269 : 2353-2356, 1994.

15 Walker G.T., Fraiser M.S., Schram J.L., Little M.C., Nadeau J.G., & Malinowski D.P. Strand displacement amplification : an isothermal in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 20 : 1691-1696, 1992.

20 West, D.B., Boozer, C.N., Moody, D.L., and Atkinson, R.L. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *Am. J. Physiol.* 262 : R1025-R1032, 1992.

25 Willow, T.E., Sheng, Z., Ishibashi, S., Herz, J. Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist. *Science*, 264 : 1471-1474, 1994.

30 Woo S.L.C. A sensitive and rapid method for recombinant phage screening. *Methods Enzymol.* 68: 389, 1979.

Yen, F.T., Mann, C.J., Guermani, L.M., Hannouche, N.F., Hubert, N., Hornick, C.A., Bordeau, V., Agnani, G., and Bihain, B.E. Identification of a lipolysis-stimulated receptor that is distinct from the LDL receptor and the 5 LDL receptor-related protein. *Biochemistry* 33 : 1172-1180, 1994.

Young R.A. and Davis R.W. Efficient isolation of genes using antibody probes. *PNAS* 80: 1194-1198, 1983a.
10

Young R.A. and Davis R.W. Yeast RNA polymerase II genes: Isolation with antibody probes. *Science* 222 : 778-782, 1983b.

15 Zhang, S.H., Reddick, R.L., Piedrahita, J.A., and Maeda, N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258 : 468-471, 1992.

20 Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372 : 4425-4432, 1994.

25 Zhong, G., Romagnoli, P., and Germain, R.N. Related leucine-based cytoplasmic targeting signals in invariant chain and major histocompatibility complex class II molecules control endocytic presentation of distinct determinants in a single protein. *J. Exp. Med.* 185 : 30 429-438, 1997.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide, caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'acides aminés choisie parmi :

5

a) une séquence d'acides aminés selon la figure 2, la figure 4, la figure 6, la figure 8, la figure 10, la figure 40, la figure 42, la figure 44, la figure 49, la figure 50 ou la figure 51 ;

10

b) une séquence d'acides aminés de polypeptide variant de polypeptide de séquence d'acides aminés de a) ;

15

c) une séquence d'acides aminés de polypeptide équivalent à un polypeptide de séquence d'acides aminés de a) ou b) ;

20

d) une séquence d'acides aminés de polypeptide homologue comportant au moins 80 % d'homologie, de préférence au moins 90 %, avec un polypeptide de séquence d'acides aminés de a), de b), ou de c) ;

25

e) une séquence d'acides aminés d'un fragment, de préférence biologiquement actif, de polypeptide de séquence d'acides aminés de a), de b), de c), ou de d) .

25 2. Polypeptide caractérisé en ce qu'il est constitué d'une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences d'acides aminés de a), b), c), d), ou e) selon la revendication 1.

30 3. Polypeptide selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que sa séquence d'acides aminés est choisie parmi une séquence humaine d'acides aminés.

4. Séquence d'acide nucléique isolée, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 3.

5. 5. Séquence d'acide nucléique isolée caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :

10 a) les séquences nucléiques selon la figure 1, la figure 3, la figure 5, la figure 7, la figure 9, la figure 31, la figure 38, la figure 39, la figure 41, la figure 43, la figure 46, la figure 47 ou la figure 48 ;

15 b) les séquences nucléiques de variant allélique de a) ;

c) les séquences nucléiques mutées des séquences de a) ou b) ;

20 d) les séquences nucléiques équivalentes des séquences de a), b) ou c) ;

e) les séquences nucléiques homologues des séquence de a), b), c) ou d), et présentant au moins 80 % d'homologie, de préférence 90 % ;

25 f) les fragments de séquences nucléiques a), b), c), d) ou e) comportant au moins 10 bases ;

g) les séquences nucléiques capables de s'hybrider spécifiquement avec les séquences nucléiques a), b), c), d), e) ou f) et comportant au moins 10 bases.

RECEPTEUR COMPLEXE LSR, ACTIVITE, CLONAGE, ET
APPLICATIONS AU DIAGNOSTIC, A LA PREVENTION ET/OU
5 AU TRAITEMENT DE L'OBESITE ET DES RISQUES OU
COMPLICATIONS ASSOCIES.

DEPOSANT : GENSET
10 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM)

ABREGE DESCRIPTIF

15
L'invention concerne un nouveau polypeptide récepteur
complexe LSR (Lipolysis Stimulated Receptor),
caractérisé par ses activités fonctionnelles, le clonage
20 des ADNc complémentaires des ARNs messagers codant pour
chacune des sous-unités du complexe multimérique, des
vecteurs et cellules transformées, des méthodes de
diagnostic et de sélection de composés utilisables à
titre de médicament pour la prévention et/ou le
25 traitement de pathologies et/ou de pathogénies telles
que l'obésité et l'anorexie, les hyperlipidémies,
l'athérosclérose, le diabète, l'hyper-tension, et plus
généralement les diverses pathologies associées à des
anomalies du métabolisme des cytokines.

30